

Université de Sherbrooke

Dystroglycan, un récepteur de la matrice extracellulaire impliqué dans la crypte intestinale

Par

Amélie Sallenbach-Morrisette
Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé en vue de l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en Biologie Cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Janvier 2018

Membres du jury d'évaluation

Pr. Jean-François Beaulieu, département d'Anatomie et Biologie Cellulaire
Pr. Nathalie Perreault, département d'Anatomie et Biologie Cellulaire
Pr. Véronique Moulin, Département de Chirurgie, Faculté de Médecine, Université Laval

© Amélie Sallenbach-Morrisette, 2018

Vous échouerez, c'est inévitable.
Le plus important c'est comment vous vous servez de vos échecs.

- J.K. Rowling

Dystroglycan, un récepteur de la matrice extracellulaire impliqué dans la crypte intestinale

Par

Amélie Sallenbach-Morrisette

Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en Biologie Cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Dystroglycan est une protéine encodée par le gène DAG1. Elle a d'abord été découverte dans le muscle au sein du complexe protéique associé à la dystrophine. Suite à une modification post-traductionnelle, dystroglycan est clivé en deux sous-unités; alpha-dystroglycan qui est extracellulaire et bêta-dystroglycan qui est transmembranaire. Les deux sous-unités se lient l'une à l'autre permettant le lien entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire. Une mutation de la protéine ou une glycosylation anormale d'alpha-dystroglycan sont à l'origine de certains types de dystrophies musculaires telle que la dystrophie musculaire de Duchenne. Bien que le rôle de dystroglycan soit bien connu dans les muscles, on en sait très peu à propos de son rôle dans l'épithélium intestinal. Nous avons d'abord confirmé la localisation de la protéine dans l'épithélium intestinal. Dans les premiers stades du développement (9-12 semaines), dystroglycan est localisé à la base des cellules épithéliales prolifératives, puis tend à se concentrer dans la moitié inférieure de la crypte à des stades plus avancés (20 semaines) et dans l'épithélium adulte. Nous avons aussi vérifié l'expression de dystroglycan dans deux modèles cellulaires. La protéine était bien exprimée dans les cellules HIEC (Human Intestinal Epithelial Crypt); une lignée cellulaire indifférenciée et proliférative. La protéine a aussi été détectée dans les cellules Caco-2/15 (modèle entérocytaire) indifférenciées. Cela suggère que la protéine dystroglycan est importante dans le maintien de l'état d'indifférenciation/prolifération de l'épithélium intestinal. Pour valider cette hypothèse, nous avons utilisés un shARN pour réprimer l'expression de dystroglycan. Nous avons ensuite étudié les effets de la perte d'expression de dystroglycan sur la prolifération et migration des cellules. Les résultats montrent une diminution de la prolifération via une courbe de prolifération et une réduction de l'incorporation de BrdU. De plus, il semblerait qu'une réduction de la migration survienne dans les cellules réprimées pour dystroglycan. Ces résultats suggèrent l'importance de dystroglycan pour le maintien de l'homéostasie de la crypte intestinale.

Mots-clés : Dystroglycan, Crypte intestinale, cellules HIEC, cellules Caco-2/15, prolifération

Table des matières

Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations et des sigles	ix
1. INTRODUCTION	1
1.1 Le dystroglycan	1
1.1.1 Structure du dystroglycan	1
1.1.2 Localisation cellulaire et tissulaire du dystroglycan	1
1.1.2.1 La membrane basilaire	2
1.1.2.2 Les laminines	3
1.1.3 Les modifications post-traductionnelles du dystroglycan	4
1.1.4 Les ligands du dystroglycan	4
1.1.5 Les fonctions du dystroglycan	6
1.1.6 Pathologies associées à dystroglycan	7
1.1.6.1 Dystroglycanopathies	7
1.1.6.2 Dystroglycan et le cancer	9
1.2 L'épithélium intestinal	11
1.2.1 L'épithélium intestinal et l'expression des laminines	13
1.2.2 L'épithélium intestinal et le dystroglycan	13
1.3 Projet et hypothèse de recherche	14
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	15
2.1 Immunofluorescence sur tissu	15
2.2 Culture cellulaire	15
2.3 Extraction protéique	16

2.4 Immunobuvardage de type western.....	17
2.5 Extraction d'ARN et production d'ADN complémentaire.....	18
2.6 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel (quantitatif).....	18
2.7 Clonage du promoteur DAG1.....	20
2.8 Essai luciférase.....	21
2.9 Génération de lignées stables shARN.....	21
2.10 Courbe de prolifération	22
2.11 Incorporation de BrdU.....	22
2.12 Test de cicatrisation	23
2.13 Test de clivage du PARP.....	24
2.14 Statistiques.....	24
2.15 Anticorps primaires et secondaires.....	25
3. RÉSULTATS	26
3.1 Localisation de β -dystroglycan dans l'iléon fœtal et adulte par immunofluorescence.	26
3.2 Expression de l'ARN messager du dystroglycan dans les cellules HIEC et Caco-2/15	26
3.3 Expression protéique de β -dystroglycan dans les cellules HIEC et Caco-2/15.....	31
3.4 Évaluation de l'activité du promoteur de DAG1 par un essai luciférase dans les cellules HIEC.	31
3.5 Abolition de l'expression de dystroglycan dans les cellules HIEC via shARN.....	35
3.6 Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la prolifération des cellules HIEC.....	38
3.7 Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la migration des cellules HIEC.	38
3.8 Effet de la régulation négative de β -dystroglycan sur la survie des cellules HIEC.....	43
4. DISCUSSION.....	45
4.1 Localisation de β -dystroglycan dans l'iléon fœtal et adulte.	45
4.2 Expression de l'ARN messager et de la protéine β -dystroglycan dans les cellules HIEC.....	45
4.3 Expression de l'ARN messager et de la protéine β -dystroglycan dans les cellules Caco-2/15.	46
4.4 Évaluation de l'activité du promoteur de DAG1 par un essai luciférase dans les cellules HIEC.	47

4.5 Abolition de l'expression de dystroglycan dans les cellules HIEC via shARN.....	50
4.6 Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la prolifération des cellules HIEC.....	51
4.7 Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la migration des cellules HIEC.	52
4.8 Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la survie des cellules HIEC.....	53
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	54
6. REMERCIEMENTS	lv
7. RÉFÉRENCES	lvi

Liste des tableaux

Tableau 1 : Anticorps Primaire et Secondaire.....	p.25
---	------

Liste des figures

Figure 1 : Structure et localisation cellulaire du dystroglycan.....	p. 2
Figure 2 : Une mutation sur α -dystroglycan empêche sa liaison aux laminines	p. 8
Figure 3 : Clivage de l'extrémité N-terminal de β -dystroglycan par MMP2 et MMP9.....	p. 10
Figure 4 : La crypte intestinale.....	p. 11
Figure 5 : Test de cicatrisation.....	p. 23
Figure 6 : Localisation de β -dystroglycan dans l'iléon fœtal de 19 semaines.....	p. 27
Figure 7 : Localisation de β -dystroglycan dans l'iléon adulte.....	p. 28
Figure 8 : Expression d'ARNm de β -dystroglycan dans les cellules HIEC.....	p. 29
Figure 9 : Expression d'ARNm de β -dystroglycan et de sucrase isomaltase dans les cellules Caco-2/15.....	p. 30
Figure 10 : Expression protéique de β -dystroglycan dans les cellules HIEC.....	p. 32
Figure 11 : Expression protéique de β -dystroglycan dans les cellules Caco-2/15.....	p. 33
Figure 12 : Évaluation de l'activité du promoteur de DAG1 par un essai luciférase dans les cellules HIEC.....	p. 34
Figure 13 : Abolition de l'expression de dystroglycan dans les cellules HIEC via shARN	p. 36
Figure 14 : Validation de l'abolition de l'expression de dystroglycan dans les cellules HIEC	p. 37
Figure 15 : Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la prolifération des cellules HIEC via une courbe de prolifération.....	p. 39
Figure 16 : Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la prolifération des cellules HIEC via l'incorporation de BrdU.....	p. 40
Figure 17 : Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la migration des cellules HIEC sans inhibition de la prolifération.....	p. 41
Figure 18 : Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la migration des cellules HIEC avec inhibition de la prolifération.....	p. 42
Figure 19 : Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la survie des cellules HIEC.....	p. 44

Liste des abréviations et des sigles

a.a. : Acides aminés
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
BrdU : Bromodésoxyuridine
CBC: Crypt Based Columnar cells
Ct : Threshold cycle
Dag1 : Dystrophin Associated Glycoprotein 1
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
dNTPs : Désoxynucléotide Triphosphates
DO : Densité Optique
Dp71 : Dystrophine de 71kDa
Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2
HIEC : Human Intestinal Epithelial Crypt based cells
HRP : Horseradish Peroxydase
IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LARGE : like-acétylglucosaminyltransférase
MEC : Matrice Extracellulaire
MMP2 : Matrix Metalloproteinase 2
MMP9 : Matrix Metalloproteinase 9
nNOS : Oxyde citrique synthase
PARP : Poly(ADP-Ribose) polymérase
PBS : Tampon Phosphate Salin
PCR : Polymerase Chain Reaction / Réaction de polymérisation en chaîne
PFA : Paraformaldéhyde
POMGnT1 : Protéine O-linked-mannose beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransférase 1
POMT1 : protéine O-mannosyltransférase 1
POMT2 : protéine O-mannosyltransférase 2
qPCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
RPM : Rotation par minute
SDS : dodécylsulfate de sodium
SEA : Sperme protéine, Entérokinase et Agrine
SH2 : Src-Homologie 2
SH3 : Src-Homologie 3
shARN : short hairpin ARN / petit ARN en épingle à cheveux
Taq polymerase : polymérase *Thermus aquaticus*
XGal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

1. INTRODUCTION

1.1 Le dystroglycan

1.1.1 Structure du dystroglycan

Le dystroglycan est une protéine qui a d'abord été découverte dans le muscle au sein du complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine (Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992). Elle est encodée par le gène DAG1 et est traduite en une protéine précurseur de 97 kDa. Suite à une modification post-traductionnelle, la protéine précurseur est clivée en deux sous-unités. Ces sous-unités sont appelées α -dystroglycan et β -dystroglycan. La sous-unité alpha a un poids moléculaire variant entre 120 et 180 kDa. Cette variation de poids moléculaire est due à une hyper-glycosylation ayant lieu sur le domaine mucine de la sous-unité. La sous-unité bêta quant à elle, a un poids moléculaire de 43 kDa. Les particularités de cette sous-unité sont son domaine transmembranaire ainsi que son motif PPXY (Barresi and Campbell 2006).

1.1.2 Localisation cellulaire et tissulaire du dystroglycan

Dans la cellule, le domaine transmembranaire de β -dystroglycan lui permet de se localiser à la membrane. Ainsi, le domaine n-terminal de β -dystroglycan est situé à l'extérieur de la cellule et son domaine c-terminal est à l'intérieur. Le motif PPXY de son domaine c-terminal lui permet de se lier au motif WW de la dystrophine. Cette dystrophine est elle-même liée au cytosquelette d'actine. Du côté extracellulaire, le domaine n-terminal de β -dystroglycan (acides aminés 654 à 750) se lie de façon non covalente au domaine c-terminal d' α -dystroglycan (acides aminés 550 à 585) (Akhavan et al. 2008). La sous-unité alpha est donc entièrement extracellulaire (Figure 1). Le domaine mucine hyperglycosylé d' α -dystroglycan lui permet de se lier à plusieurs ligands extracellulaires dont les laminines-1 et -2. De cette façon, dystroglycan permet de faire le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine (Michele and Campbell 2003).

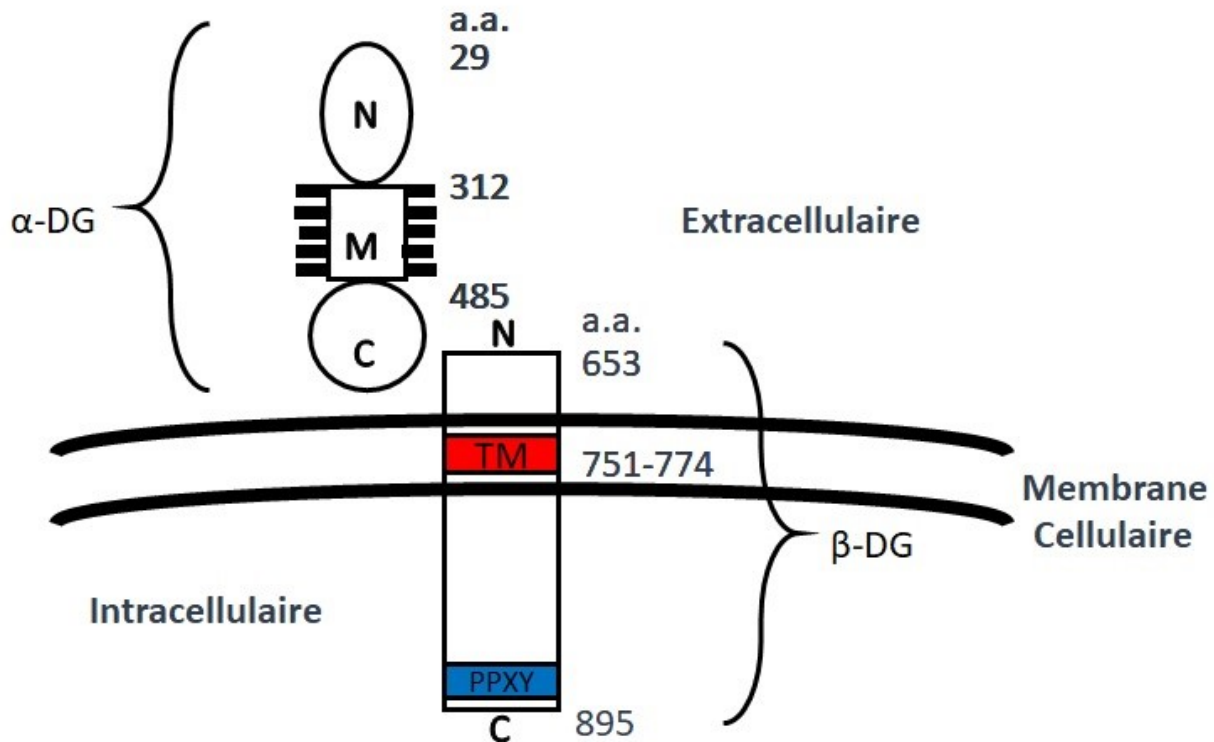


Figure 1 : Structure et localisation cellulaire du dystroglycan.

DG = Dystroglycan (alpha et bêta), N = Extrémité N-terminale (amine), C = Extrémité C-terminale (carboxyle), M = Domaine Mucine fortement glycosylé, TM = Domaine transmembranaire, PPXY = motif Proline-Proline-X-Tyrosine, a.a. = Acides Aminés donnant la position des domaines et motif sur la protéine.

1.1.2.1 La membrane basilaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau macromoléculaire non-cellulaire. La membrane basilaire est un type de matrice extracellulaire que l'on retrouve autour des épithéliums, endothéliums, les cellules musculaires, le tissu conjonctif, les cellules de Schwann, les nerfs périphériques et dans tout le système nerveux central. Elle joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité et de la compartimentalisation des tissus, la filtration et autres processus développementaux. La membrane basilaire est principalement composée de laminines, collagènes de type IV, nidogènes et protéoglycans héparane sulfate (Miner 2008). Les interactions entre les cellules épithéliales et la membrane basilaire régulent des fonctions telles que la croissance cellulaire, la différenciation, la forme des cellules, l'expression des gènes et la polarité tissulaire (Muschler et al. 2002, Vllasaliu et al. 2014).

1.1.2.2 Les laminines

L'une des composantes principales de la membrane basilaire est la laminine. Cette protéine est composée de trois chaînes (α , β et γ) qui forme une croix. Il existe 5 chaînes alpha, 3 chaînes bêta et 3 chaînes gamma encodées par des gènes différents. Sur un total de 45 isoformes possibles, seulement 18 ont été recensés.

Les principaux types de ligands des laminines sont divisés en deux classes, les intégrines et les non-intégrines. Les récepteurs de types intégrines sont les plus abondants puisqu'il s'agit d'une large famille d'hétérodimère $\alpha\beta$. Elles ont pour rôle d'initier plusieurs cascades de signalisation dans la cellule ayant un effet principalement sur la survie cellulaire. Les récepteurs non-intégrines sont nombreux. Quatre d'entre eux ont été caractérisés plus en détail : le dystroglycan, le syndécan, la glycoprotéine du groupe sanguin Lutheran (Miner 2008) et le 37/67LR (Khalifaoui et al. 2013).

En plus d'aider à la formation et au maintien de la membrane basilaire, les laminines remplissent plusieurs fonctions importantes en fonction de leur localisation et ligands. Par exemple, elles sont importantes pour la stabilisation des muscles squelettiques, l'organisation de la jonction neuromusculaire, le maintien de l'intégrité de la jonction derme-épiderme et la maturation et fonctions des poumons (Miner 2008).

Dystroglycan est une protéine exprimée dans une grande variété de tissus. On retrouve cette protéine dans le muscle, le système nerveux central et périphérique ainsi que dans les épithéliums et endothéliums (Bozzi et al. 2009).

1.1.3 Les modifications post-traductionnelles du dystroglycan

La protéine précurseur du dystroglycan subit plusieurs modifications post-traductionnelles. La première est une auto-protéolyse dans le motif SEA de la protéine. Un motif SEA est un module protéique de 120 acides aminés. Il est plus souvent associé aux protéines abondamment glycosylées et ayant un repliement caractéristique. Ce repliement est composé de deux chaînes alpha, suivi de 4 feuillets bêta et se terminant par deux chaînes alpha. Le clivage s'effectue entre les feuillets $\beta 2$ et $\beta 3$. Dans le cas du dystroglycan, ce clivage a lieu entre sa glycine 653 et sa sérine 654. La protéine dystroglycan est ainsi clivée en deux sous-unités, α -dystroglycan et β -dystroglycan (Akhavan et al. 2008).

La deuxième modification post-traductionnelle cible plus particulièrement α -dystroglycan. Il s'agit d'une glycosylation sur le domaine mucine de la sous-unité. Plusieurs enzymes de glycosylation sont impliquées dans ce processus et chacune d'elle a un rôle différent. Cette glycosylation complexe et variable est bien caractérisée dans le muscle. Le processus commence avec les enzymes POMT1/POMT2 qui sont responsables d'ajouter un mannose sur une sérine ou une thréonine. Ensuite, POMGnT1 est responsable d'ajouter une N-acétylglucosamine sur ce mannose. Le rôle de la fukutine n'est pas encore certain, mais elle semblerait être responsable de la phosphorylation d'un mannose. Finalement, LARGE est responsable de l'ajout d'un 3-Xylose- α -1,3-Glucuronic Acid sur le mannose phosphorylé de la sérine 379 précisément. Ces glycosylations sont particulièrement importantes puisqu'elles permettent l'attachement d' α -dystroglycan à ses ligands (Barresi and Campbell 2006).

1.1.4 Les ligands du dystroglycan

Dans le muscle, dystroglycan a été découvert au sein du complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine. Ce complexe est situé au niveau du sarcolemme. Les fibres du muscle squelettique sont composées de myofibrilles qui elles-mêmes sont entourées d'une membrane plasmique du muscle que l'on appelle le sarcolemme (Allikian and McNally 2007). Le cœur de ce

complexe est la dystrophine. Il s'agit d'une protéine cytoplasmique dont son extrémité en N-terminale lui permet de se lier au cytosquelette d'actine alors qu'un motif WW en C-terminale lui permet de se lier au motif PPXY (riche en proline) de β -dystroglycan. À l'extérieur de la cellule, α -dystroglycan se lie à la laminine-2 (chaîne $\alpha 2$) afin de compléter ce qu'est le cœur de la stabilité musculaire. Les autres protéines du complexe sont les sarcoglycans, le sarcospan, la dystrobrevine, la syntrophine, le nNOS (neuronal nitric oxyde synthase) et la cavéoline-3 (Bozzi et al. 2009). Les sarcoglycans se lient aussi à β -dystroglycan et le sarcospan aide à cette interaction (Allikian and McNally 2007).

Le complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine peut être très hétérogène. D'abord, dépendamment des tissus, la dystrophine peut prendre une forme plus courte appelée Dp71. Cette dystrophine de 71kDa possède 4 isoformes pouvant être retrouvés dans différents tissus non-musculaires et peut remplir les mêmes fonctions que la dystrophine complète. La dystrophine peut aussi être remplacée par son homologue l'utrophine qui est retrouvée dans presque tous les tissus incluant le muscle squelettique. Dans tous les cas, que ce soit Dp71 ou l'utrophine, ces protéines possèdent le motif WW et peuvent donc lier dystroglycan ainsi que le cytosquelette d'actine (Haenggi and Fritschy 2006). Certaines protéines comme la Cavéoline-3 ont un domaine WW ressemblant à celui de la dystrophine et de ses homologues et peuvent compétitionner pour la liaison à β -dystroglycan (Sotgia et al. 2001). Une autre protéine, la plectine, peut aussi entrer en compétition avec la dystrophine pour la liaison au motif PPXY de β -dystroglycan. La plectine est une protéine reconnue pour sa liaison au cytosquelette via les filaments intermédiaires ou l'actine (Reznicek et al. 2007).

Il a aussi été identifié qu'une phosphorylation de la tyrosine (Y) du motif PPXY de β -dystroglycan peut empêcher l'interaction du dystroglycan avec la dystrophine et ses homologues contenant le motif WW. À la place, β -dystroglycan se lie à des protéines contenant un domaine SH2 (Sotgia et al. 2001) ou SH3 comme Grb2 (Yang et al. 1995). De plus, la protéine Rapsyn retrouvée au niveau de la jonction neuromusculaire peut lier β -dystroglycan via son domaine RING-H2 sans utiliser le motif PPXY. Donc la Rapsyn et l'utrophine peuvent se lier simultanément à β -dystroglycan

(Thompson et al. 2010). Finalement, (Chen et al. 2003) ont montré que β -dystroglycan pouvait se lier directement à l'actine, donc indépendamment de la dystrophine/utrophine.

Au niveau de la matrice extracellulaire, α -dystroglycan a plusieurs ligands. Les plus connus sont les laminines -1 (chaîne $\alpha 1$) et -2 (chaîne $\alpha 2$). Cette liaison est calcium-dépendante et se produit entre le domaine globulaire de la laminine et un sucre spécifique d' α -dystroglycan mentionné plus haut (Endo 2015). Les autres ligands identifiés au fil des années sont l'agrine (Gee et al. 1994), le perlécane (Peng et al. 1998), la neurexine (Sugita et al. 2001), la pikachurine (Sato et al. 2008) et slit (Wright et al. 2012).

1.1.5 Les fonctions du dystroglycan

Les fonctions du dystroglycan sont diverses et varient en fonction du tissu où il est exprimé et du ligand auquel il se lie autant au niveau extracellulaire qu'intracellulaire. Du côté d' α -dystroglycan dans le muscle, le ligand principal est la laminine-2 (chaîne $\alpha 2$) et son rôle principal est la stabilisation musculaire (Ervasti and Campbell 1993). Au niveau de la jonction neuro-musculaire, α -dystroglycan est plutôt liée à l'agrine et est impliquée dans la stabilisation des groupes de récepteurs à l'acétylcholine post-synaptique (Gee et al. 1994). Dans la rétine, il fait partie de la « ribbon synapse » où il se lie à la pikachurine (Sato et al. 2008). La liaison d' α -dystroglycan à la neurexine lui permet aussi de jouer un rôle de molécule d'adhésion intercellulaire dans les neurones (Haenggi and Fritschy 2006). De plus, (Palmieri et al. 2017) ont montré qu'une hypoglycosylation d' α -dystroglycan pouvait affecter la migration cellulaire chez les cellules épithéliales du rein.

Du côté de β -dystroglycan, sa liaison avec la dystrophine et ses homologues lui permet de maintenir l'intégrité du muscle (Ibraghimov-Beskrovnya et al. 1992). Par contre lorsqu'il est lié à la cavéoline-3, il se produit plutôt un désassemblage du complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine (Gazzerro et al. 2009). La plectine quant à elle vient se lier à β -dystroglycan en absence de la dystrophine et peut ainsi restaurer la fonction musculaire dans certaines

dystrophies musculaires (Reznicek et al. 2007). Dans une variété de tissus, la liaison de β -dystroglycan avec Grb2 lui permet de contrôler l'organisation du cytosquelette (Russo et al. 2000). Finalement, la liaison de β -dystroglycan à la Rapsyn est importante pour la stabilisation des groupes de récepteurs à l'acétylcholine via l'agrine dans la jonction neuromusculaire (Thompson et al. 2010).

De plus, dystroglycan est important au niveau du système nerveux périphérique où il régule les fonctions des cellules de Schwann et l'organisation des nœuds de Ranvier (Masaki and Matsumura 2010). Au cours du développement, dystroglycan a aussi un rôle à jouer dans l'assemblage de la membrane basilaire via la laminine-1 (chaîne $\alpha 1$) (Henry and Campbell 1998), la formation de la jonction neuro-musculaire (Peng et al. 1998) et la morphogenèse du rein (Durbeej et al. 1995). Du côté des cellules épithéliales, il a été montré que dystroglycan joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette, le contrôle de la croissance cellulaire et dans la détermination de la polarité cellulaire dans les cellules épithéliales mammaires (Muschler et al. 2002). Alors que dans le système nerveux central, il a été montré que dystroglycan affectait la structure, prolifération et différenciation des cellules souches neurales (Schröder et al. 2007).

1.1.6 Pathologies associées à dystroglycan

1.1.6.1 Dystroglycanopathies

Dans le muscle, un groupe de dystrophies musculaires appelées dystroglycanopathies sont dues à des mutations et au mal fonctionnements des enzymes responsables de la glycosylation d' α -dystroglycan. Par exemple, une mutation dans les enzymes de glycosylation POMT1/POMT2 est associée au syndrome Walker-Warburg qui est l'une des formes les plus sévères de dystroglycanopathies puisque ces enzymes sont impliquées dans les premières étapes de la glycolisation d' α -dystroglycan (Moore and Winder 2012).

Au niveau du dystroglycan lui-même, une seule mutation a été identifiée à ce jour. Il s'agit d'une mutation faux-sens retrouvé au niveau d' α -dystroglycan qui change la thréonine 192 pour une méthionine. Cette mutation empêche le recrutement de la protéine LARGE lors de la glycosylation d' α -dystroglycan. Pour que la protéine LARGE puisse ajouter son groupement sur le mannose phosphorylé de la sérine 379, elle doit d'abord se rapprocher d' α -dystroglycan et ce rapprochement est possible grâce à la thréonine 192. Donc, en changeant cette thréonine pour une méthionine, la protéine LARGE ne peut s'approcher d' α -dystroglycan et faire son rôle. Le groupement ajouté par la protéine LARGE est primordial pour la liaison de dystroglycan avec les laminines (Figure 2). Cette mutation cause donc une importante déstabilisation du muscle (Hara et al. 2011).

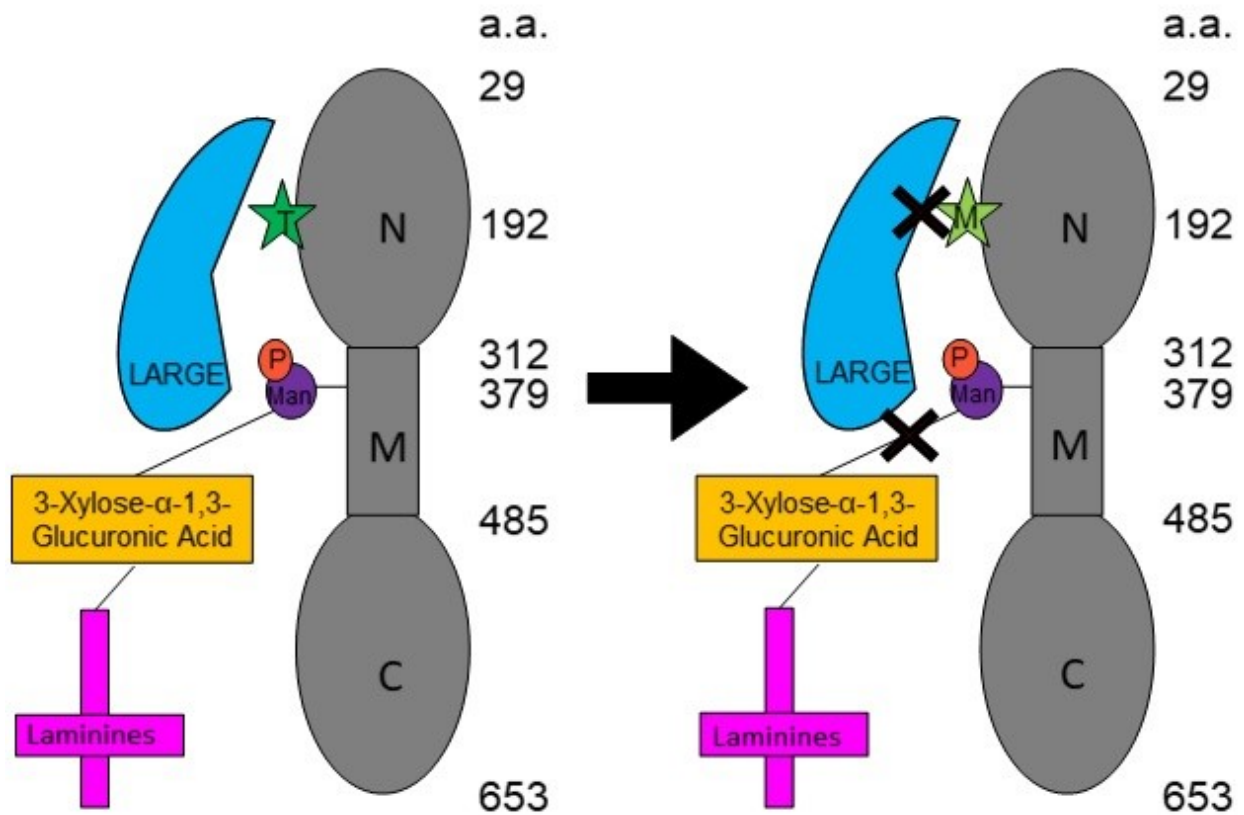


Figure 2 : Une mutation sur α -dystroglycan empêche sa liaison aux laminines.

La Thréonine 192 (T) est responsable du recrutement de la protéine LARGE auprès d' α -dystroglycan. La protéine LARGE doit ajouter son groupement au mannose (man) phosphorylé (P) pour permettre la liaison entre α -dystroglycan et les laminines. Lorsque la Thréonine 192 est mutée en Méthionine (M), le recrutement de LARGE ne peut être effectué. Cela empêchera la liaison d' α -dystroglycan aux laminines.

1.1.6.2 Dystroglycan et le cancer

Dû à son rôle d'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire, ses nombreux partenaires d'interaction et ses fonctions qui en découlent, dystroglycan peut jouer divers rôles importants dans la progression de plusieurs cancers (Brennan et al. 2004). Dans certaines lignées cellulaires cancéreuses, β -dystroglycan est clivé à son extrémité en N-terminal. Ce clivage l'empêche de se lier à α -dystroglycan qui est relâché dans le milieu extracellulaire (Losasso et al. 2000). Ces lignées cellulaires sont MCF7, HT29 et DU145 proviennent respectivement d'un cancer du sein métastatique, d'un adénocarcinome colorectal et de métastase au système nerveux central originaire d'un adénocarcinome de la prostate. Dans deux cas sur trois, il s'agit de cellules dérivées d'un adénocarcinome métastatique. Cela peut vouloir dire que la perte du contact entre α - et β -dystroglycan permet à la cellule de se détacher de la matrice extracellulaire et aller se répandre ailleurs (Yamada et al. 2001). Dans d'autres lignées cancéreuses moins haut gradées, il y a aussi une expression anormale de β -dystroglycan en même temps qu'une expression normale de celui-ci, donc il n'y a pas de perte d'expression d' α -dystroglycan (Losasso et al. 2000). Ce clivage de l'extrémité N-terminal de β -dystroglycan est causé par les métalloprotéinases matricielles 2 et 9 (MMP2 et MMP9) (Figure 3) (Shang et al. 2008).

Les métalloprotéinases matricielles sont des protéases pouvant dégrader des composants de la matrice extracellulaire ainsi que certains récepteurs à la surface de la cellule. Elles sont exprimées en conditions physiologiques ou pathologiques avec des effets sur la prolifération, la migration, la différenciation et la survie cellulaire entre autres. Les MMP2 et MMP9 sont particulièrement importantes pour l'invasion d'un cancer et les métastases (Banday et al. 2016).

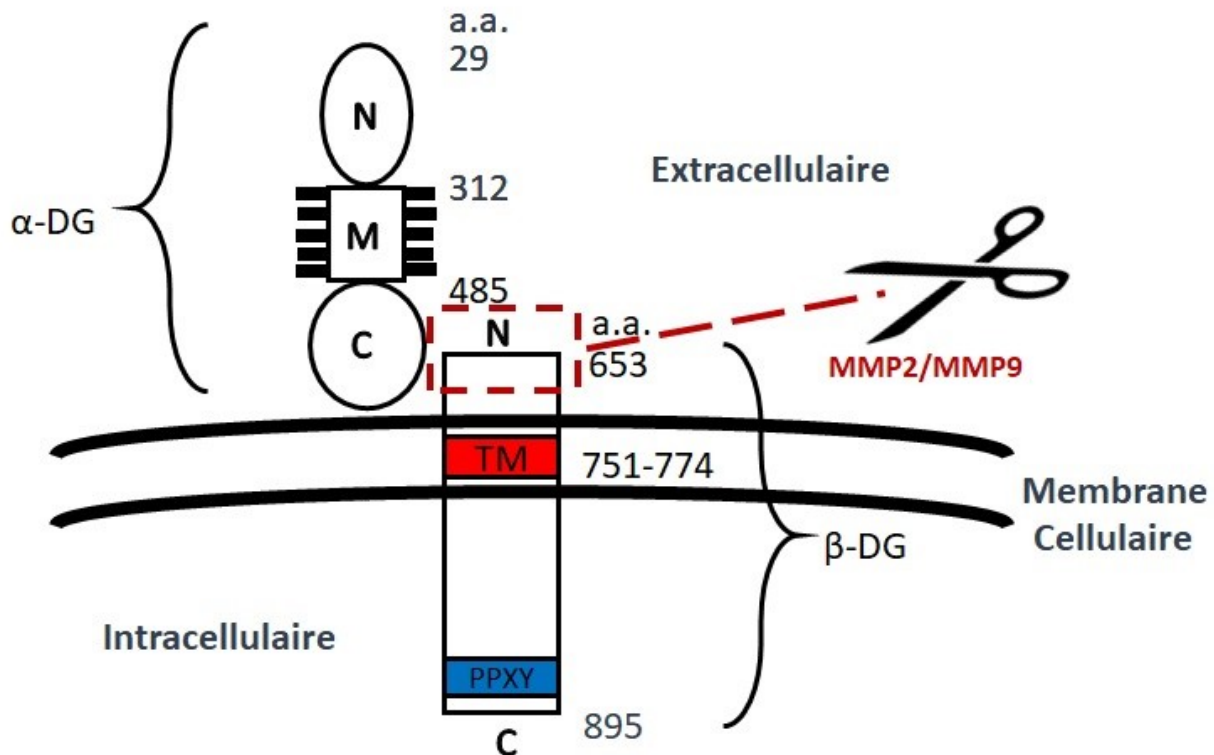


Figure 3 : Clivage de l'extrémité N-terminale de β-dystroglycan par MMP2 et MMP9.

Les MMP2 et MMP9 peuvent couper l'extrémité N-terminale de β-dystroglycan. Cela empêche ce dernier de lier l'extrémité C-terminale d'α-dystroglycan.

Dans d'autres lignées cellulaires cancéreuses épithéliales métastatique, α-dystroglycan est bel et bien présent à la membrane cellulaire, mais sous une forme hypoglycosylée. Cela l'empêche de se lier à ses ligands extracellulaires et l'empêche de faire son rôle d'ancrage de la cellule à la membrane basilaire. Cette hypoglycosylation peut être due à l'absence de l'enzyme LARGE (de Bernabé et al. 2009) ou bien à la kinase Fer pouvant intervenir dans la synthèse du sucre permettant la liaison d'α-dystroglycan avec les laminines (Yoneyama et al. 2012) montrant ainsi l'importance de la glycosylation d'α-dystroglycan pour ses fonctions.

1.2 L'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal humain se renouvelle environ tous les cinq jours (Vermeulen and Snippert 2014) et est donc très approprié pour l'étude de certains phénomènes biologiques tels que la prolifération, la migration et l'expression tissu-spécifique de certains gènes. À la base de ce système dynamique est retrouvé l'axe cryptes-villosité (Roostae et al. 2016). Il est à noter qu'il y a présence de plusieurs cryptes pour une seule villosité (Parker et al. 2017). Il est important de bien réguler la balance entre prolifération, migration, différenciation et mort cellulaire afin de maintenir l'homéostasie de l'épithélium intestinal (Bastide et al. 2007).

La crypte intestinale peut être divisée en trois sections; le tiers inférieur (zone de cellules souches et Paneth), le tiers médian (zone d'amplification) et le tiers supérieur (zone de différenciation terminale) (Figure 4).

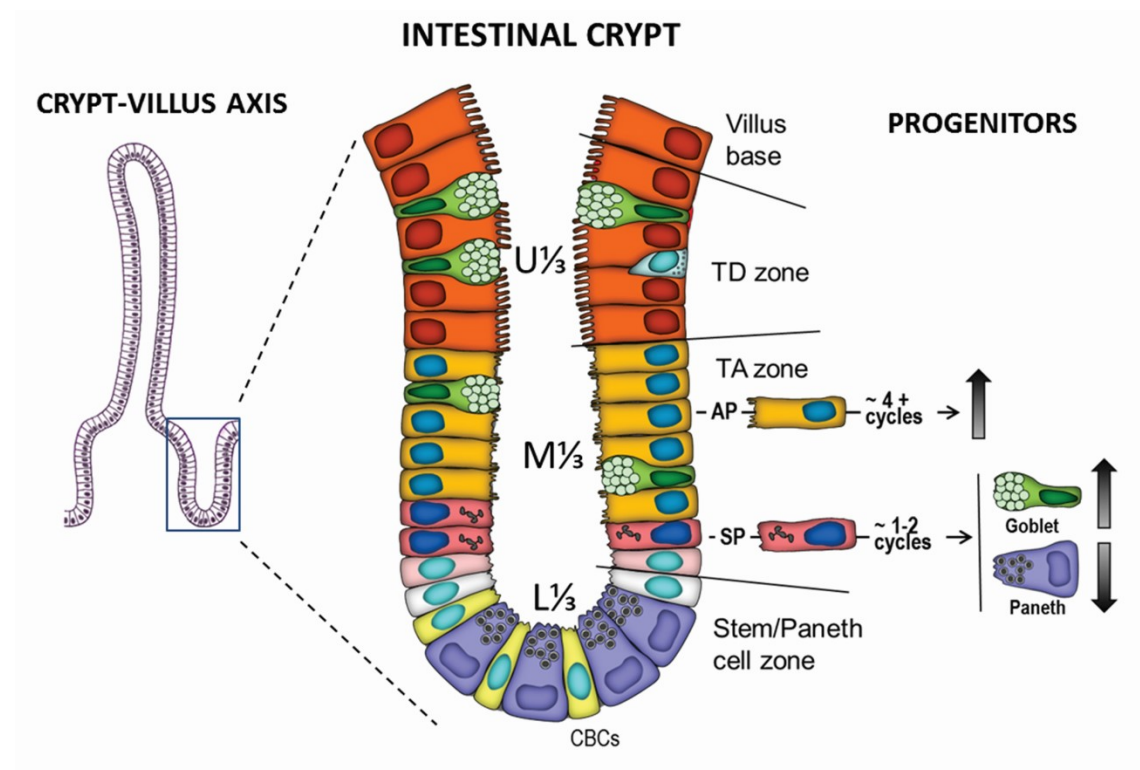


Figure 4 : La crypte intestinale.

Schéma de la crypte intestinale montrant les trois zones principales. La zone de cellules souches et Paneth (Stem/Paneth cell zone), la zone d'amplification (TA zone) et la zone de différenciation terminale (TD zone). Figure provenant de Roostae et al. Journal of cellular physiology, 2016.

Le tiers inférieur est composé de cellules souches CBC (Crypt Base Columnar) et de cellules de Paneth. Au niveau du tiers médian, les cellules souches CBC se transformeront en deux types de cellules progénitrices. Les cellules progénitrices absorbantes pourront donner un seul type cellulaire; les cellules absorbantes. Les cellules progénitrices sécrétrices pourront donner les trois autres types cellulaires; les cellules de Paneth, entéroendocrines et caliciformes. Les progéniteurs de cellules sécrétrices n'effectuent qu'une ou deux divisions dans le tiers médian avant d'enclencher le processus de différenciation. Ainsi, il est possible de retrouver des cellules caliciformes et des cellules entéroendocrines différenciées dans le tiers médian. Les cellules de Paneth quant à elle, ne seront jamais retrouvées dans le tiers supérieur. Elles se différencieront aussi dans le tiers médian, puis suivront une migration descendante dans le tiers inférieur afin de s'insérer entre les cellules souches CBC. Les progéniteurs de cellules absorbantes subiront quatre divisions et plus. Le processus de différenciation terminale des cellules absorbantes s'entame donc uniquement dans le tiers supérieur de la crypte. Cela en fait le type cellulaire le plus abondant puisque les progéniteurs de cellules absorbantes subissent 2 à 4 fois plus de cycles de division que les progéniteurs de cellules sécrétrices (Roostae et al. 2016).

Les cellules absorbantes ont un domaine apical en forme de bordure en brosse; composé de microvillosités. Ces microvillosités favorisent l'absorption des nutriments contenus dans le bol alimentaire. Les cellules entéroendocrines permettent la sécrétion de plusieurs hormones intestinales nécessaires à la digestion. Les cellules caliciformes ont un rôle de protection de l'épithélium intestinal via le mucus qu'elles sécrètent. Les cellules de Paneth sécrètent plusieurs peptides antimicrobiens permettant la protection de l'épithélium intestinal contre des pathogènes (Crosnier et al. 2006).

1.2.1 L'épithélium intestinal et l'expression des laminines

Puisque la laminine est le ligand principal du dystroglycan, il est important de regarder son expression dans l'épithélium intestinal. Au cours du développement, à 8 semaines, les laminines-1 (chaîne $\alpha 1$), -5 (chaîne $\alpha 3$) et -10 (chaîne $\alpha 5$) sont exprimées au même endroit puisqu'à ce stade du développement l'épithélium intestinal est un épithélium pluristratifié. Entre 9 et 14 semaines, l'épithélium intestinal est composé de villosités et d'espace intervillositaire qui sont les cryptes en devenir. À ce stade, les laminines-5 (chaîne $\alpha 3$) et -10 (chaîne $\alpha 5$) sont exprimées dans tout l'épithélium alors que la laminine-1 est seulement exprimée dans l'espace intervillositaire.

À 16 semaines de développement, la laminine-1 (chaîne $\alpha 1$) est remplacée par la laminine-2 (chaîne $\alpha 2$). Entre 16 et 20 semaines, la crypte se forme. La laminine-2 (chaîne $\alpha 2$) est exprimée dans la moitié inférieure de la crypte, l'expression de la laminine-10 (chaîne $\alpha 5$) débute à la moitié de la crypte jusqu'à l'apex de la villosité et la laminine-5 (chaîne $\alpha 3$) est exprimée dans toute la villosité. Chez l'adulte, la laminine-2 (chaîne $\alpha 2$) est exprimée uniquement dans le tiers inférieur de la crypte intestinale, l'expression de la laminine-10 (chaîne $\alpha 5$) débute dans le tiers supérieur de la crypte jusqu'à l'apex de la villosité et la laminine-5 (chaîne $\alpha 3$) est exprimée uniquement au niveau de la villosité (Teller and Beaulieu 2001).

1.2.2 L'épithélium intestinal et le dystroglycan

Le dystroglycan est exprimé dans presque tous les tissus. Beaucoup d'articles mentionnent son expression et ses fonctions dans les épithéliums du sein, du poumon ou encore du rein. Par contre, très peu d'articles le mentionne dans l'épithélium intestinal. D'abord, Sgambato et al. 2003 ont montré que l'expression de dystroglycan était réduite dans les cancers du sein et du côlon. Ils ont montré que cette réduction était due à des modifications post-traductionnelles et non au niveau de l'expression du gène ou du messager. Ils ont repris les explications sur les métalloprotéinases pouvant cliver l'extrémité en N-terminal de β -dystroglycan et causer la perte de la liaison avec α -dystroglycan. Ensuite, Driss et al. 2006 se sont intéressés aux interactions

entre le dystroglycan et les intégrines chez les cellules épithéliales intestinales. Les conclusions de leurs recherches étaient que l'activation de dystroglycan par la laminine-1 augmenterait l'interaction entre les intégrines $\beta 1$ et dystroglycan alors que l'activation de dystroglycan par la laminine-2 aurait l'effet contraire. Leur expérience a été faite sur des cellules Caco-2 à 15 jours après leur dernier passage. Étrangement, à aucun moment ils n'ont tenu compte du fait que la laminine-1 n'est pas exprimée dans l'épithélium intestinal adulte. Finalement, Coco et al. 2012 ont montré qu'une augmentation de l'expression de CD133 et une réduction de l'expression de dystroglycan pouvaient être synonyme de mauvais pronostic pour les patients atteints du cancer du côlon. Ils sont les seuls à avoir montré l'expression d' α -dystroglycan dans le côlon par immunohistochimie. Leurs résultats suggèrent une expression d' α -dystroglycan à la base des cellules, dans le stroma ainsi que dans le cytosol des cellules caliciformes dans le côlon sain, puis une perte d'expression d' α -dystroglycan dans les tissus cancéreux. Donc, les études sur le dystroglycan dans l'épithélium intestinal portent davantage sur le cancer.

1.3 Projet et hypothèse de recherche

Dystroglycan est une protéine très importante pour les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire. Cela le mène à avoir diverses fonctions pour la cellule. Ses fonctions changent selon ses ligands ainsi que le tissu où il est exprimé. Dystroglycan a été très bien étudié dans le muscle et l'est de plus en plus dans les tissus non-musculaires tels que les épithéliums. Toutefois, il semble y avoir un manque d'informations sur cette protéine dans l'épithélium intestinal en dehors de son rôle potentiel dans le cancer du côlon.

Puisque les connaissances sur cette protéine dans l'épithélium intestinal se font rares, le but de ce projet de maîtrise est d'établir une base d'information sur le sujet.

L'hypothèse est que dystroglycan serait impliqué dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Immunofluorescence sur tissu

Utilisation de cryo-coupes d'intestin fœtal et adulte de 3µm. Les coupes ont été fixées sur lames avec du paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich) 2% (PFA 2%) pendant 45 minutes à 4°C. Afin de neutraliser l'auto-fluorescence causée par les sous-groupes aldéhydes, une solution de PBS-Glycine 1X pH7.4 a été utilisée pendant 45 minutes à 4°C. Les sites non-occupés ont ensuite été bloqués avec une solution de blocage fait de lait en poudre dilué à 5% dans du PBS 1X dans laquelle les coupes ont été incubées pendant 1h à la température de la pièce. Les anticorps primaires (voir tableau 1) ont été dilués dans la solution de blocage, ajoutés sur les coupes et le tout a été incubé pendant une nuit (18 heures) à 4°C. Les anticorps secondaires Alexa Fluor® (Vert-488) ont été dilués dans la solution de blocage, ajoutés sur les coupes et incubés pendant une heure à la température de la pièce. Trois lavages de 10 minutes ont été effectués dans le PBS 1X avant et après l'anticorps secondaire. Les coupes ont ensuite été incubées 3 minutes dans une solution de 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 0,67mM/PBS puis dans le bleu d'Evans 0,1 dilué à 1/5 dans le PBS 1X pendant 1 minute. Le DAPI se lie fortement aux bases adénine et thymine de l'ADN permettant le marquage des noyaux des cellules alors que le bleu d'Evans permet de colorer tout le tissu. Deux lavages de 10 minutes dans le PBS 1X ont été effectués avant et après la coloration au bleu d'Evans. Dans certains cas, les coupes ont été fixées de nouveau au PFA 2% pendant 15 minutes à 4°C. Pour monter les lames de microscopie, le milieu de montage fluorescent (Dako) a été utilisé. Les coupes ont été observées au microscope à fluorescence DMRXA (Leica).

2.2 Culture cellulaire

La lignée cellulaire HIEC a été isolée d'un iléum fœtal à 17-19 semaines de développement (Perreault and Beaulieu 1996). Elle représente des cellules indifférenciées de la crypte intestinale.

Ces cellules peuvent être utilisées entre autres pour étudier l'apoptose induite par Fas, les interactions matrice-cellules et le métabolisme des lipides (Beaulieu and Ménard 2012).

La lignée cellulaire Caco-2/15 est un sous-clone des cellules Caco-2. Les cellules Caco-2 ont été isolées en 1974 par Jorgen Fogh au Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Rye, New-York à partir d'un carcinome colorectal modérément à bien différencié issu d'un patient de 72 ans. La particularité de cette lignée cellulaire c'est qu'elle peut se différencier spontanément en cellules absorbantes à l'atteinte de la confluence. Les cellules Caco-2/15 quant à elles, ont été sélectionnées pour leur expression importante de marqueurs de différenciation terminale des cellules absorbantes telle que la sucrase-isomaltase (Beaulieu J. F. and Quaroni 1991).

Les cellules ont été cultivées dans un environnement composé de 5% de CO₂ et 95% d'air. Les cellules HIEC ont été cultivées dans le milieu OPTI-MEM (Gibco/Life Technologies) 4% sérum foetal bovin (Multicell, Wisent), 1% HEPES (Multicell, Wisent), 1% Glutamax (Glutamax, Gibco/Life Technologies) et 160µl d'EGF 10ng/ml (0.0032ng/ml). Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées dans le milieu Dubelco's Modified Eagle's Medium (Gibco/Life Technologies) avec 10% de sérum foetal bovin (Multicell, Wisent), 1% de tampon HEPES 1M (Multicell, Wisent) et 1% de glutamine (Glutamax, Gibco/Life Technologies). Les milieux ont été changés tous les deux à trois jours. Les cellules de chaque pétri ont été récoltées à différents stades de confluence.

2.3 Extraction protéique

Les cellules HIEC et Caco-2/15 ont été récoltées dans du Laemmli (Tris-HCl 1M, SDS 5%, Glycérol 20% et bleu de bromophénol 2%) 1x. Les lysats protéiques ont été soumis à un minimum de 20 pulsions et un maximum de 80 pulsions, dépendamment de leur consistance, au sonicateur (Branson Sonifier 250, Emerson Industrial Automation), puis centrifugés 20 minutes à 12000 xg. Le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube. Les échantillons ont été réduits avec du β-Mercaptoéthanol 4% et chauffés à 95°C pendant 5 minutes.

2.4 Immunobuvardage de type western

Les échantillons protéiques ont migré dans un gel de SDS-polyacrylamide 12% selon la méthode de Thomas and Kornberg (Thomas and Kornberg 1975). Un courant de 70 volts a été appliqué pendant environ 1 heure afin que les échantillons puissent migrer dans le gel d'entassement. Puis un courant de 150 volts a été appliqué pendant environ 4 heures lorsque les échantillons ont atteint le gel de séparation. Les protéines du gel de SDS-polyacrylamide ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories) lors d'un transfert de 1h30 à un courant de 100 volts. Le transfert a été effectué dans un tampon de transfert (Tris 3.03mg/ml et glycine 14.4mg/ml) contenant 20% de méthanol sauf dans le cas de protéines ayant un poids moléculaire de plus de 100kDa. Les sites non-occupés par des protéines ont été bloqués avec une solution de blocage fait de lait en poudre dilué à 5% dans du PBS 1x contenant 0.2% de Tween-20 (Fisher Scientific) pour un minimum d'une heure à la température de la pièce. Les anticorps primaires (voir tableau 1) ont été utilisés à 4°C pendant une incubation d'une nuit (18 heures) sauf dans le cas de l'anticorps pour la sucrase isomaltase qui a été incubée à température pièce. Les membranes ont été lavées trois fois 10 minutes dans une solution de PBS/Tween 0.2%. Des anticorps secondaires (voir tableau 1) couplés à l'enzyme Horseradish Peroxydase (HRP) ont été utilisés à la température de la pièce pendant une incubation d'une heure. Tous les anticorps ont été dilués dans la solution de blocage. La révélation des protéines se fait avec l'ajout d'un substrat chimiluminescent d'HRP aussi appelé Immobilon (Millipore). La méthode consiste à utiliser deux solutions d'Immobilon 1:1 qui sont une solution de peroxyde et un réactif de luminol. Les membranes sont incubées 5 minutes dans cette solution d'Immobilon. Dans une chambre noire, un film photographique (AMERSHAM) est inséré dans la cassette contenant la membrane et exposé pour un temps variable de quelques secondes à plusieurs minutes dépendamment des anticorps utilisés. Les protéines sont ensuite révélées sur le film par chimiluminescence. Le logiciel de densitométrie Imagej a ensuite été utilisé afin de quantifier les variations entre les bandes des différents échantillons. De plus, pour chaque échantillon, la valeur calculée par le logiciel a pu être rapportée sur celle de la protéine de β -actine correspondante afin de normaliser les résultats.

2.5 Extraction d'ARN et production d'ADN complémentaire

Les cellules HIEC et Caco-2/15 ont été récoltées avec un réactif d'extraction d'ARN, RiboZol (AMRESCO). Les lysats d'ARN ont été gardés à -80°C. Puis l'extraction d'ARN totale a été effectuée comme décrite précédemment dans l'article de (Teller et al. 2007). Le culot d'ARN a été resuspendu dans un volume approprié de RNA secure (Thermo Fisher Scientific), un réactif permettant d'inactiver les ribonucléases de façon irréversible, puis chauffé à 60°C pendant 10 minutes. Les échantillons ont été placés à -80°C pour un minimum de 24 heures avant d'être quantifié. La quantification des échantillons d'ARN s'est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre mesurant la densité optique (DO) de l'échantillon à 260nm. Avec la loi de Beer-Lambert il a été possible de calculer la concentration de l'échantillon à partir de la valeur de DO à 260nm. De plus, pour valider la pureté de l'ARN, le ratio DO à 260nm sur 280nm a été calculé. Seuls les échantillons avec un ratio d'absorbance 260/280 compris entre 1.8 et 2.2 ont été conservés. Un ratio d'absorbance 260/280 compris entre 1.8 et 2.2 correspond à un échantillon d'ARN contenant peu ou pas de contaminants tels que des protéines. L'ADN complémentaire a été obtenue par transcription inverse à partir des échantillons d'ARN. La transcription inverse a été réalisée à partir de l'enzyme Reverse Transcriptase d'Omniscrypt (Qiagen), 1µM d'amorces d'Oligo(dT), 500µM de dNTPs (GE Healthcare) et 2µg d'ARN total. La solution est incubée 1 heure à 37°C comme précédemment décrit dans l'article de Ni et al. 2005.

2.6 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel (quantitatif)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sert à amplifier une région spécifique d'ADN. La PCR s'effectue en présence d'un brin d'ADN, une polymérase d'ADN, un tampon optimal pour la polymérase, des désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) et des amorces spécifiques à la région que l'on veut amplifier. Le tout est placé dans un tube à PCR, puis dans la machine à PCR. La machine devra être programmée pour un cycle thermique optimal à l'utilisation que l'on veut en faire. La première température, souvent 94°C, sert à séparer les brins d'ADN. La deuxième température appelée température d'appariement est calculée en fonction des amorces utilisées.

Il s'agit de la température idéale pour permettre aux amorces de se lier à l'ADN simple-brin de façon spécifique. La troisième température, souvent 72°C, est optimale pour que la polymérase d'ADN puisse synthétiser de nouveaux brins d'ADN en utilisant les dNTPs. Ces trois changements de températures durent chacun de 30 secondes à 1 minute, parfois plus selon les besoins. Cela correspond à un cycle thermique. En général, 40 cycles sont effectués pour une PCR traditionnelle. De plus, avant le premier cycle, il y a l'initialisation qui permet à la machine d'atteindre la température optimale de 94°C avant de commencer, puis à la fin des 40 cycles, il est courant de laisser quelques minutes supplémentaires pour l'élongation des brins d'ADN. Par la suite, l'ADN peut être quantifié à l'aide d'un gel d'agarose et récupérer pour diverses expériences.

La PCR en temps réel, aussi appelée PCR quantitative ou qPCR, permet de suivre l'amplification de l'ADN cible en temps réel et non seulement à la toute fin. Pour ce faire, un colorant fluorescent de détection et un colorant de référence sont utilisés. Le tube à PCR comprend donc l'ADN de base, les amorces spécifiques ainsi qu'une solution pour qPCR (Green-2-Go Low Rox, Bio Basic) contenant l'ADN polymérase, le tampon adéquat à la polymérase, du $MgCl_2$, le colorant fluorescent vert et le colorant de référence ROX. L'appareil à qPCR effectue des cycles thermiques de la même façon que l'appareil à PCR standard. À la fin du programme, il y aura génération de courbes d'amplification montrant l'amplification d'ADN de chaque échantillon en fonction de chaque cycle effectué. Cela permet au programme de déterminer le cycle limite (threshold cycle ou « ct ») de chaque échantillon. Le « ct » est le cycle auquel la fluorescence de l'échantillon atteint son seuil maximal de détection. À partir du « ct » il est possible de quantifier l'ADN de chaque échantillon via une courbe standard ou bien faire une comparaison relative des « ct » de chaque échantillon. Dans notre cas, nous avons utilisé la méthode Pfaffl (Pfaffl 2001) pour la quantification relative de nos échantillons. Nous avons utilisés le gène de référence RPLP0 dont la stabilité a été validée dans les modèles de cellules épithéliales intestinales (Dydenborg et al. 2006).

2.7 Clonage du promoteur DAG1

Un promoteur du gène DAG1 court (198 paires de bases) et long (842 paires de bases) ont été clonés. Chacun des promoteurs commencent au même endroit avec la même amorce. Pour ce faire, une PCR a été effectuée en utilisant un échantillon d'ADN complémentaire provenant de cellules HIEC, la Taq polymérase et son tampon (New England Biolabs), les dNTPs, de l'eau sans ribonucléase et les amorces spécifiques à chaque longueur de promoteur. Dans le cas du promoteur long, la PCR s'est fait deux fois. Tout d'abord avec les amorces longues, puis le produit de PCR a été utilisé comme matrice d'ADN pour une deuxième PCR avec les amorces moyennes. Les produits de PCR pour les deux promoteurs ont été migrés sur un gel d'agarose 1%, puis la bande correspondante a été coupée. L'ADN a été extraite du gel d'agarose par électroélution et a été purifiée par une extraction phénol-chloroforme. Le dosage de l'ADN s'est fait en migrant 1µl d'ADN sur un gel d'agarose 1%. À l'aide de la concentration approximative obtenue, il a été possible de faire une ligation dans un vecteur PGEM-T (Promega). Le vecteur et les inserts ont d'abord été digérés par les enzymes de restriction Mlu1 et Xho1. Par la suite, 150ng d'inserts a été ajouté à 50ng de vecteur en présence d'ADN ligase et de son tampon 2x (Promega). La ligation s'est fait à 4°C pendant la nuit (18 heures). Suite à la ligation, le plasmide recombinant (vecteur et insert) a été transformé dans des cellules compétentes (JM109 High-Efficiency Competent Cells, New England Biolabs) par choc thermique. Le produit de ligation a été placé dans un tube avec des cellules compétentes et incubé sur glace pendant 20 minutes. Le tube a ensuite été transféré à 42°C pour 45-50 secondes puis retourné sur glace pour un 2 minutes additionnel. Puis, 950µl de milieu SOC (Promega) a été ajouté au tube et le tout a été incubé à 37°C avec agitation à 150 RPM pour 1h30. Un volume de 100µl du produit de transformation a été prélevé et déposé sur des plaques LB ampicilline sur lesquelles de l'IPTG et du X-Gal ont été ajoutés. Les plaques ont été incubées à 37°C toute la nuit (18 heures). Le lendemain, les pétris étaient couverts de colonies bleues et blanches, seulement 10 colonies blanches ont été sélectionnées au hasard. Les colonies ont été ajoutées à 4ml de bouillon LB et incubées avec agitation à 37°C toute la nuit (18 heures). À partir de ces bouillons de culture, une miniprep a été effectuée selon le protocole du fabricant (Qiagen). L'obtention du vecteur contenant l'insert désiré a été validé par digestion enzymatique suivi d'une migration sur gel d'agarose 1%, puis par séquençage. Suite à la validation

de la séquence, une digestion enzymatique a été faite et migrée sur gel d'agarose 1% afin de récupérer l'insert. La même méthode que précédemment à partir de l'électroélution jusqu'au séquençage a été effectuée afin de cloner l'insert dans le vecteur pLightSwitch_Prom (Promega). La seule différence au protocole a été l'ajout d'IPTG/X-Gal et la sélection bleue-blanc puisque ce nouveau vecteur ne contient pas le gène LacZ.

2.8 Essai luciférase

Des cellules HIEC ont été transférées dans une plaque de douze puits et transfectées en suivant le protocole de transfection de l'Effectine (Qiagen). Les cellules ont été cotransfectées avec la Firefly Luciférase (Promega) et le promoteur court ou long du gène DAG1. L'expérience a été réalisée en triplicata. Chaque triplicata contenait soit le vecteur vide, le vecteur contenant le promoteur court ou le vecteur contenant le promoteur long. Après 6h de transfection, les cellules ont été lavées avec du PBS 1x stérile et du milieu frais a été ajouté à chaque puits. Après 48h, les cellules ont été récupérées dans du PLB1x (Passive Lysis Buffer - Promega) et l'essai luciférase s'est déroulé selon le protocole du fabricant (Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega). Une seule modification a été apportée au protocole : 10µl de lysat cellulaire a été utilisé au lieu de 20µl. Les mesures ont été calculées par le luminomètre (Orion Microplate Luminometer, Berthold Technologies).

2.9 Génération de lignées stables shARN

Les cellules HIEC ont étéensemencées à une confluence de 70% 24 heures avant les infections lentivirales de cinq shARN de séquences distinctes (Sigma-Aldrich) ciblant spécifiquement l'ARN messager (ARNm) de dystroglycan. Deux jours après les infections lentivirales, les cellules HIEC ont été divisées dans de nouvelles pétries et soumises à une sélection par l'ajout de puromycine (Qiagen) 0.1µg/ml pendant 5 jours. Les cellules ont été récoltées à sous-confluence et l'expression protéique de β -dystroglycan a été analysée par immunobuvardage de type western afin de confirmer l'efficacité des différents shARN.

2.10 Courbe de prolifération

Les cellules HIEC contenant les différents shARN contre dystroglycan ont été comptées alors qu'elles étaient à sous-confluence. Cent milles cellules ont été ajoutées à chaque puits d'une plaque de 12 puits en triplicata. Les comptes cellulaires ont été effectués aux temps 24h, 96h et 144h. Tous les comptes cellulaires ont été effectués à l'aide d'un compteur de cellules (Bio-Rad).

2.11 Incorporation de BrdU

Les cellules HIEC contenant les différents shARN contre dystroglycan ont été comptées etensemencées sur de petites lamelles de verres dans une plaque 12 puits en triplicata. Cent milles cellules ont été ajoutées à chaque puits. Après 120h d'incubation, 1µl du réactif 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 1000x a été ajouté à chaque puits. La plaque a été incubée 4h à 37°C afin de permettre l'incorporation du BrdU. Le milieu a ensuite été aspiré et les cellules ont été brièvement lavées au PBS 1x. Puis, 1ml de méthanol pur froid a été ajouté à chaque puits et la plaque a été incubée 10 minutes à -20°C afin de fixer les cellules. Par la suite, 3 lavages de 5 minutes ont été faits avec du PBS 1x et 1ml de HCl 4M a été ajouté pendant 8 minutes à la température de la pièce afin d'exposer l'ADN nucléaire. Cela a été suivi de 3 lavages de 5 minutes au PBS 1x. Les sites inoccupés des lamelles ont été bloqués dans une solution de BSA-0.5%/Tween-0.1%/PBS1x pendant 10 minutes à la température de la pièce. Les lamelles ont ensuite été incubées 45 minutes à 37°C avec l'anticorps BrdU (In Situ Cell Proliferation KIT FLUOS®, ROCHE) dilué 1/50 dans la solution de blocage. Trois lavages de 5 minutes au PBS 1x ont été effectués par la suite. Puis, les cellules ont été incubées dans du DAPI dilué 1/50000 dans le PBS 1X pendant 3 minutes, suivi de deux lavages de 5 minutes au PBS 1x. Les lamelles ont finalement été fixées sur une lame de microscope à l'aide du milieu de montage fluorescent (Dako). Au microscope, 4 photos à 20x de chaque condition ont été prises pour le DAPI et l'anticorps fluorescent vert BrdU. Le nombre de noyaux marqués au BrdU a été comptés et divisé par le nombre de noyaux totaux (DAPI), puis le tout a été calculé en pourcentage d'incorporation de BrdU.

2.12 Test de cicatrisation

Les cellules HIEC contenant les différents shARN contre dystroglycan ont étéensemencées dans une plaque six puits (un puits par condition). Lorsque les cellules ont atteint la confluence, une première marque verticale a été effectuée à l'aide d'une lame de rasoir (Figure 5 a). Puis, trois blessures ont été faites aux cellules avec un embout de 200µl (Figure 5 b). Cela a donné six points d'observation (Figure 5 c) pour la cicatrisation des blessures. Des photos ont été prises au moment des blessures, puis à toutes les 24 heures jusqu'à la guérison complète; c'est-à-dire jusqu'à ce que la surface soit de nouveau complètement couverte de cellules. L'expérience a été effectuée à deux reprises en absence d'hydroxyurée, puis deux fois en présence d'hydroxyurée 2mM afin d'inhiber la prolifération cellulaire.

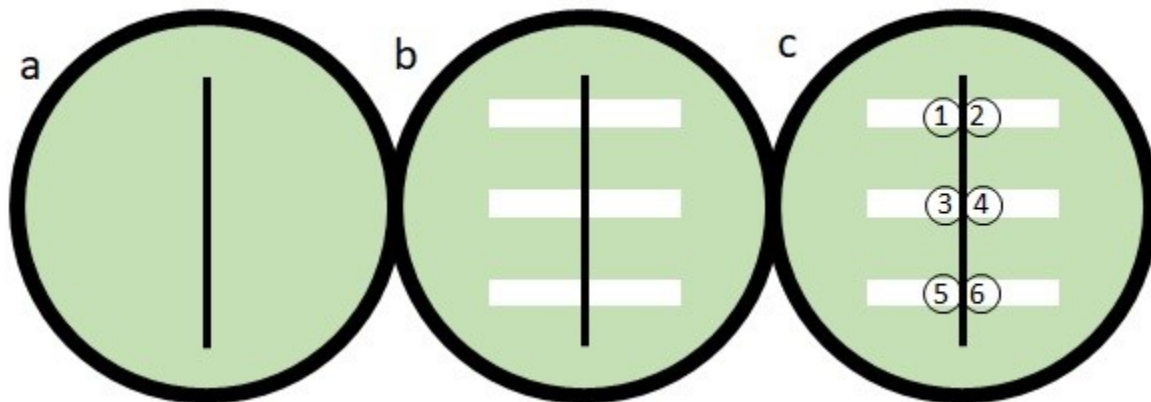


Figure 5 : Test de cicatrisation.

Une première marque verticale a été effectuée à l'aide d'une lame de rasoir (a). Puis, trois blessures ont été faites aux cellules avec un embout de 200µl (b). Cela a donné six points d'observation (c) pour la cicatrisation des blessures.

2.13 Test de clivage du PARP

Les cellules HIEC contenant les différents shARN contre dystroglycan ont été récoltées à sous-confluence dans un tampon Laemmli 1x. Une extraction protéique et un immunobuvardage de type western ont été réalisés afin d'analyser l'expression protéique du PARP. Le PARP, aussi appelé Poly(ADP-Ribose) Polymérase, est important pour des processus cellulaires tels que la réparation d'ADN et la mort cellulaire programmée. Le PARP est une molécule cible de la caspase-3 qui est elle-même activée en situation de mort cellulaire (Morales et al. 2014). En absence de mort cellulaire, le PARP a un poids de 116 kDa. En présence de mort cellulaire, la caspase-3 peut cliver le PARP qui aura alors un poids moléculaire de 89 kDa. Avec un immunobuvardage de type western il est possible de déterminer s'il y a présence ou non de mort cellulaire dans l'échantillon (Oliver et al. 1998).

2.14 Statistiques

Chaque expérience, sauf exception mentionnée, a été effectuée trois fois. Les graphiques ont été faits à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7. La significativité des résultats a été calculée avec le test statistique ANOVA pairé en multi-comparaison du logiciel GraphPad Prism 7 pour un *p-value* inférieur à 0,05.

2.15 Anticorps primaires et secondaires

Tableau 1 : Anticorps primaires et secondaires

	Anticorps	Espèce	Fournisseur	Dilution Immuno- buvar dage	Dilution Immuno- fluorescence
Anticorps Primaires	β -actine	Souris	Millipore	1/100000	-
	β -dystroglycan	Souris	ABCAM	1/1000	1/200
	PARP	Lapin	Cell Signaling	1/250	-
	Sucrase Isomaltase	Souris	Pr. Jean-François Baulieu, UdeS	1/10	-
Anticorps Secondaires	Alexa-488	Souris	Invitrogen	-	1/400
	HRP-Mouse	Souris	GE Healthcare	1/3000	-
	HRP-Rabbit	Lapin	GE Healthcare	1/3000	-

3. RÉSULTATS

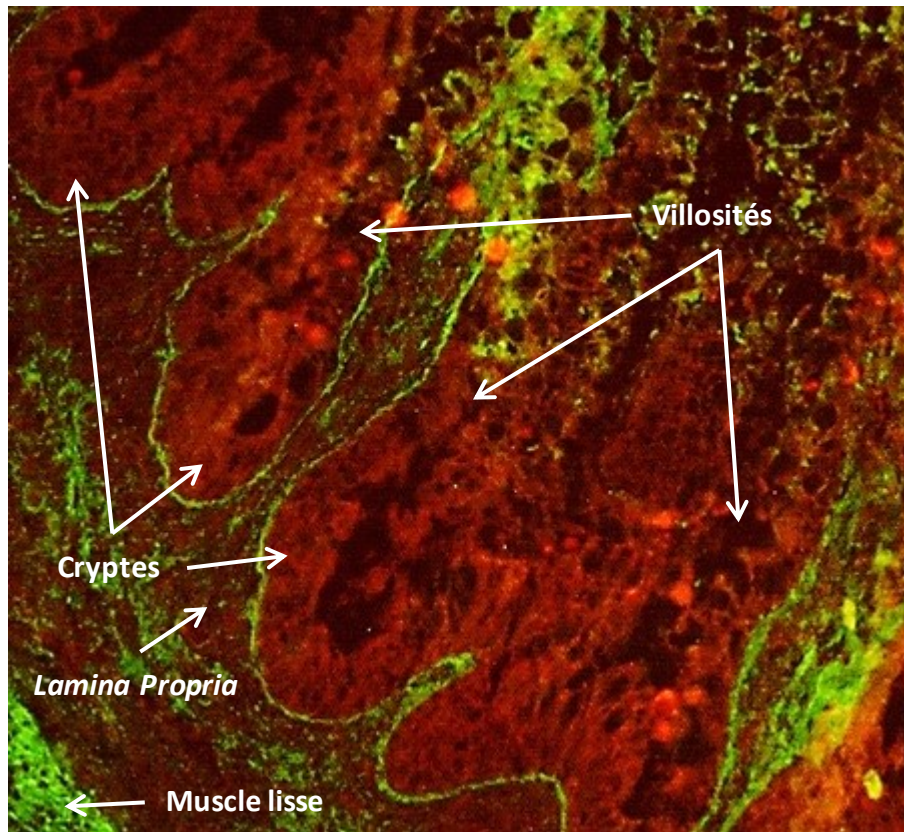
3.1 Localisation de β -dystroglycan dans l'iléon fœtal et adulte par immunofluorescence.

La localisation intestinale de β -dystroglycan a été déterminée par des immunofluorescences sur tissus. D'abord dans l'iléon fœtal de 19 semaines (Figure 6), puis dans l'iléon adulte (Figure 7). Dans les deux cas, il est possible d'observer le β -dystroglycan à la base des cellules dans la partie inférieure des cryptes, dans le muscle lisse ainsi que dans la *lamina propria*. Par contre, dans l'iléon fœtal, β -dystroglycan est localisé dans la moitié inférieure des cryptes alors que chez l'adulte, il est localisé dans le tiers inférieur des cryptes intestinales.

3.2 Expression de l'ARN messenger du dystroglycan dans les cellules HIEC et Caco-2/15

L'expression d'ARN messenger du dystroglycan a été analysée dans les cellules HIEC à différents stades de confluences par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (Figure 8). Les résultats ont été exprimés relativement au gène de référence RPLP0. De la sous-confluence à 20 jours post-confluence, l'expression d'ARN messenger du dystroglycan varie peu dans ces cellules.

L'expression d'ARN messenger du dystroglycan a été analysée dans les cellules Caco-2/15 à différents stades de confluences par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (Figure 9). Chaque série de cellules Caco-2/15 est constituée de cellules à sous-confluence (SC), confluence (Conf) ainsi qu'à 5 (5PC), 10 (10PC), 15 (15PC) et 20 (20PC) jours post-confluence. Une série de cellules Caco-2/15 valide devrait se différencier progressivement en entérocytes à l'atteinte de la confluence. Afin de valider les différentes séries de cellules Caco-2/15, l'expression de la sucrase isomaltase, un marqueur de différenciation terminale des entérocytes, a aussi été analysée (Figure 9). Les résultats du dystroglycan et de la sucrase isomaltase ont été exprimés relativement au gène de référence RPLP0. Il est possible d'observer une baisse d'expression significative du dystroglycan dans les cellules Caco-2/15 à 5, 15 et 20 jours post-confluence ainsi qu'une augmentation d'expression significative de la sucrase isomaltase à 10 et 20 jours post-confluence par rapport aux cellules à sous-confluence selon un test ANOVA ayant un *p-value* inférieur à 0,05.



25X

Figure 6: Localisation de β -dystroglycan dans l'iléon fœtal de 19 semaines.

Le tissu est coloré au bleu d'Evans (rouge) et β -dystroglycan est marqué en vert. Il s'agit d'un grossissement de 25X pour lequel les cryptes et une partie des villosités sont visibles.

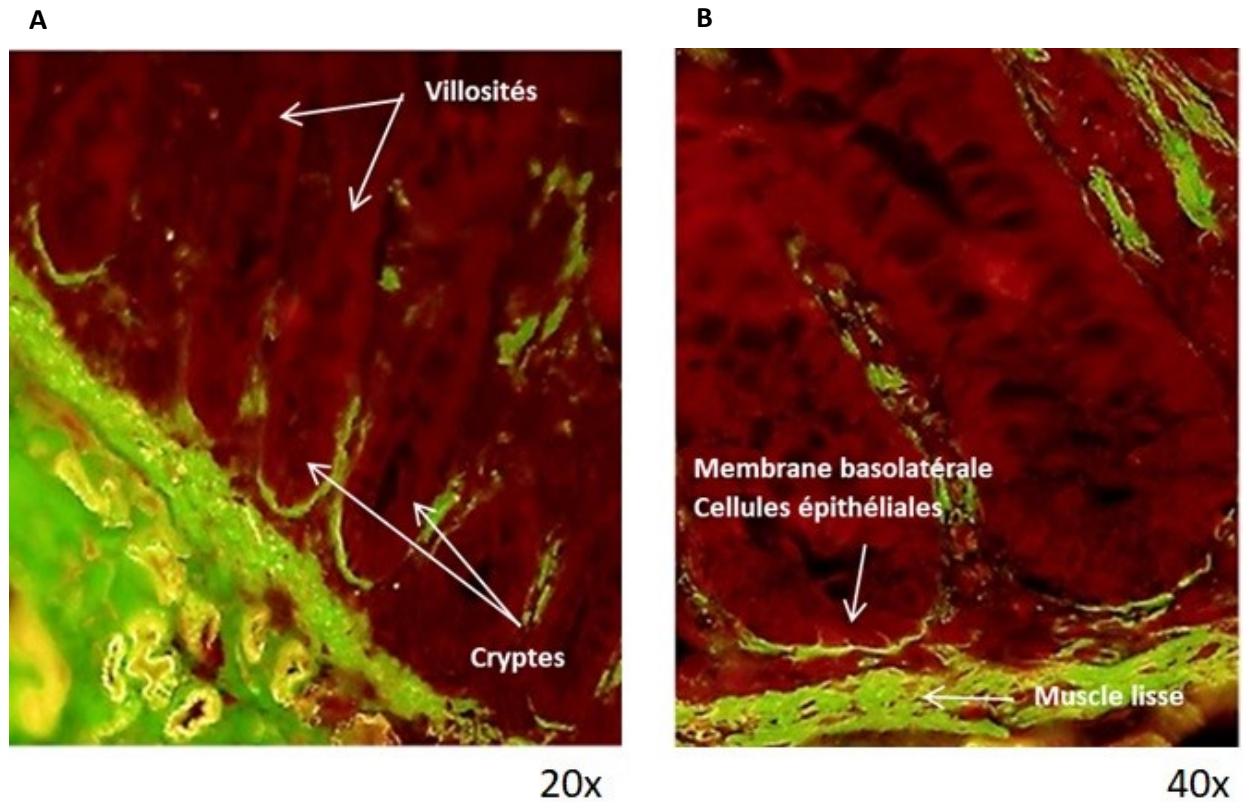


Figure 7: Localisation de β -dystroglycan dans l'iléon adulte

Le tissu est coloré au bleu d'Evans (rouge) et β -dystroglycan est marqué en vert. En A, le grossissement de 20X permet de voir plusieurs cryptes et le début des villosités. En B, le grossissement de 40X permet de voir deux cryptes intestinales partielles.

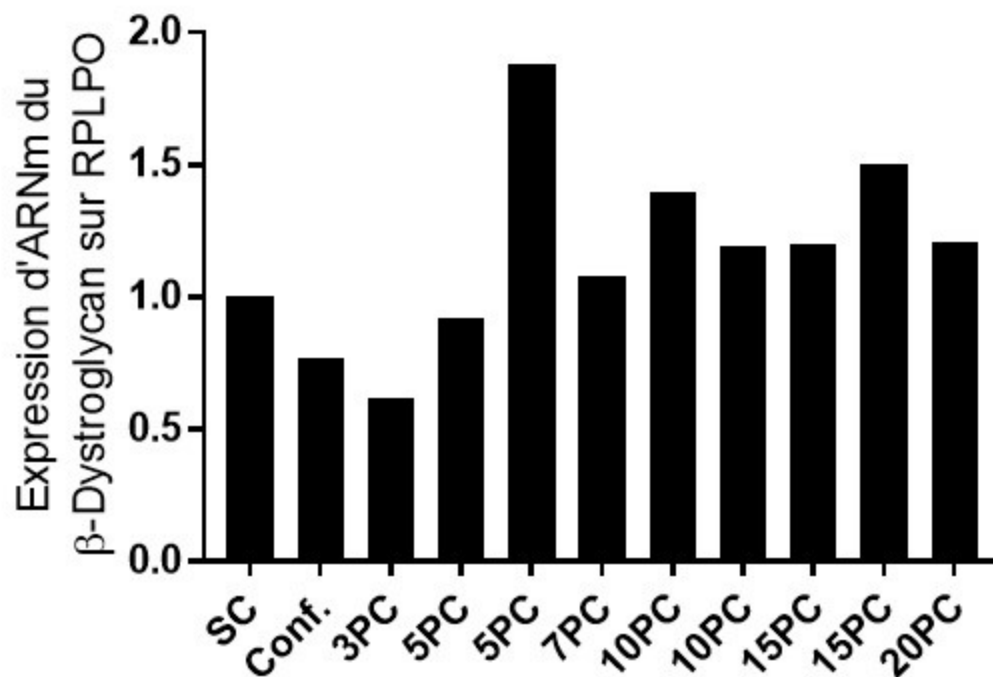


Figure 8: Expression d'ARNm de β-dystroglycan dans les cellules HIEC.

L'expression de l'ARNm de β-dystroglycan a été analysée dans les cellules HIEC de la sous-confluence à 20 jours post-confluence. L'expression de β-dystroglycan est exprimée relativement au gène de référence RPLP0. Le test a été effectué une seule fois (n=1).

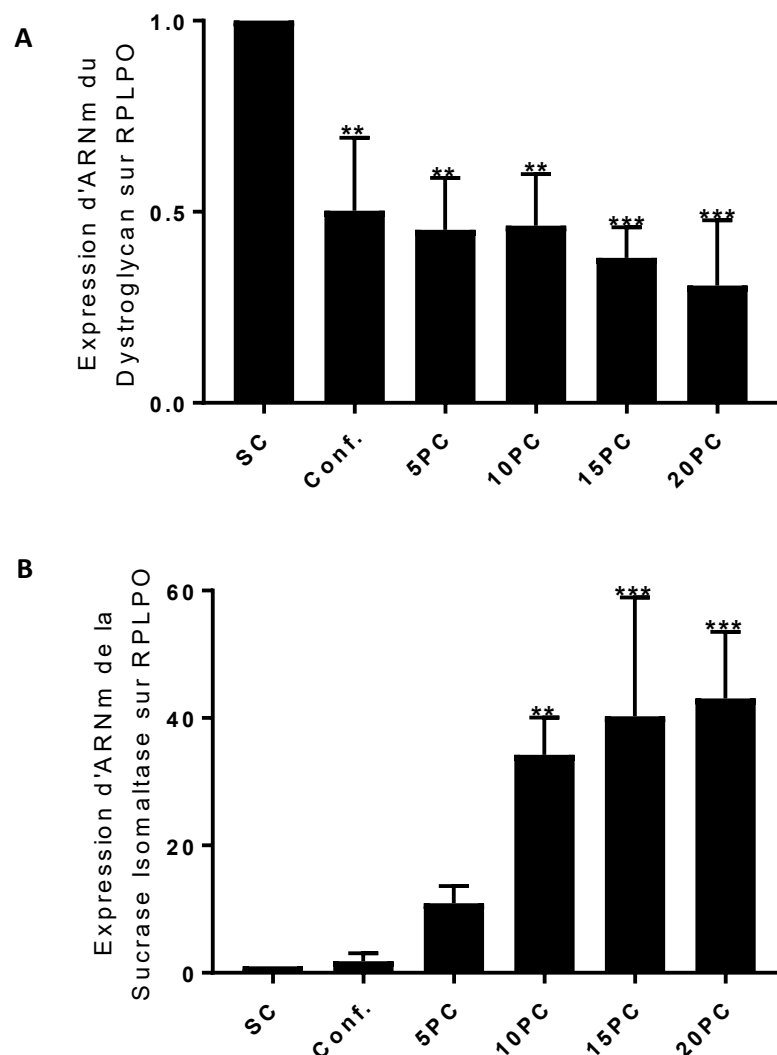


Figure 9: Expression d'ARNm de β -dystroglycan et de la sucrase isomaltase dans les cellules Caco-2/15.

L'expression d'ARNm de β -dystroglycan et de la sucrase isomaltase a été observée dans les cellules Caco-2/15 de la sous-confluence à 20 jours post-confluence (a). L'expression de β -dystroglycan (A) et de la sucrase isomaltase (B) est exprimée relativement au gène de référence RPLP0. La significativité (*) a été calculée par rapport à la sous-confluence (SC) à l'aide d'un test ANOVA pour un *p-value* inférieur à 0,05 (n=3). ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$

3.3 Expression protéique de β -dystroglycan dans les cellules HIEC et Caco-2/15.

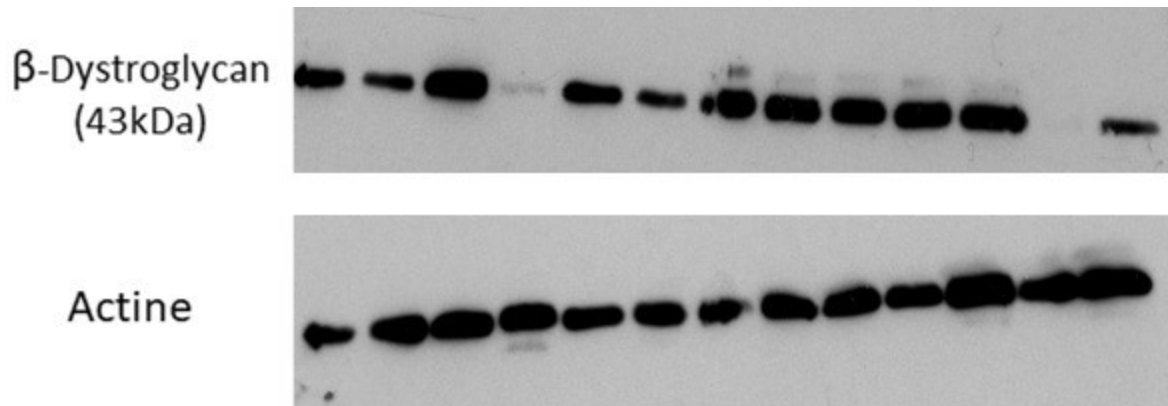
L'expression du β -dystroglycan a été analysée dans les cellules HIEC à différents stades de confluences par immunobuvardage de type western (Figure 10 A). Les résultats du β -dystroglycan ont été exprimés relativement à la protéine de référence actine (Figure 10 B). De la sous-confluence à 20 jours post-confluence, il y a très peu de changements d'expression du β -dystroglycan.

L'expression du dystroglycan et de la sucrase isomaltase a été analysée dans les cellules Caco-2/15 à différents stades de confluences par immunobuvardage de type western (Figure 11 A). Les résultats de la sucrase isomaltase (Figure 11 B) et du β -dystroglycan (Figure 11 C) ont été exprimés relativement à la protéine de référence actine. À sous-confluence, il y a une forte expression du β -dystroglycan, puis celle-ci est diminuée de la confluence à 20 jours post-confluence. Pour la sucrase isomaltase, l'expression est nulle à sous-confluence et confluence puis augmente de 5 jours post-confluence à 20 jours post-confluence. Cette augmentation d'expression est significative à 15 jours post-confluence selon un test ANOVA pour un *p-value* inférieur à 0,05.

3.4 Évaluation de l'activité du promoteur de DAG1 par un essai luciférase dans les cellules HIEC.

Le promoteur *Dag1* a été cloné deux fois afin d'obtenir un promoteur court (198pb) et un promoteur long (842pb). Les clonages ont été validés par séquençage. Lors de l'essai luciférase, un vecteur vide, un vecteur contenant le promoteur court et un vecteur contenant le promoteur long ont été utilisés. Le vecteur contient le gène de la renilla luciférase. La firefly luciférase a été ajoutée à la réaction en tant que contrôle de transfection. Les résultats sont exprimés en termes d'activité de la renilla sur la firefly. Les résultats obtenus avec les promoteurs courts et longs ainsi que le vecteur vide ont été rapportés sur ce dernier (Figure 12). Le vecteur vide est normalisé à 1, le vecteur contenant le vecteur court montre une activité d'environ 20 et le vecteur contenant le promoteur long montre une activité d'environ 60.

A



B

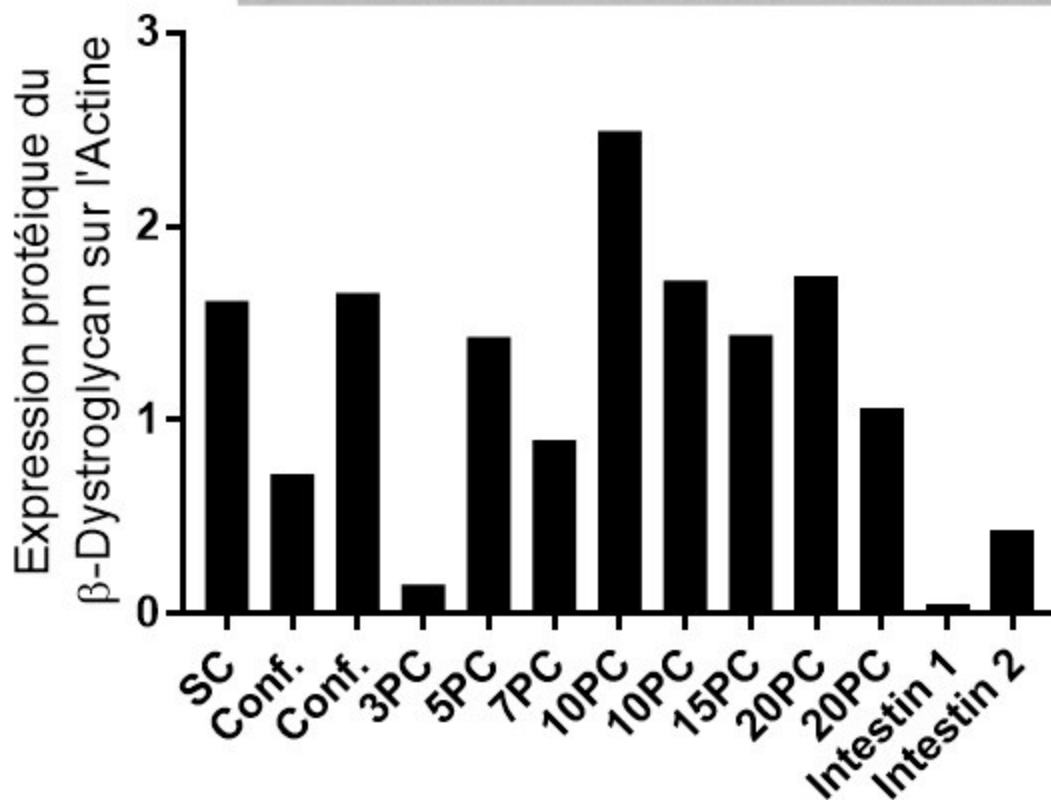


Figure 10: Expression protéique de β -dystroglycan dans les cellules HIEC.

L'expression protéique de β -dystroglycan et de l'actine a été analysée dans les cellules HIEC de la sous-confluence à 20 jours post-confluence ainsi que dans deux échantillons d'intestins (A). L'expression de β -dystroglycan a été rapportée sur l'expression d'actine (B). Le test a été effectué une seule fois (n=1).

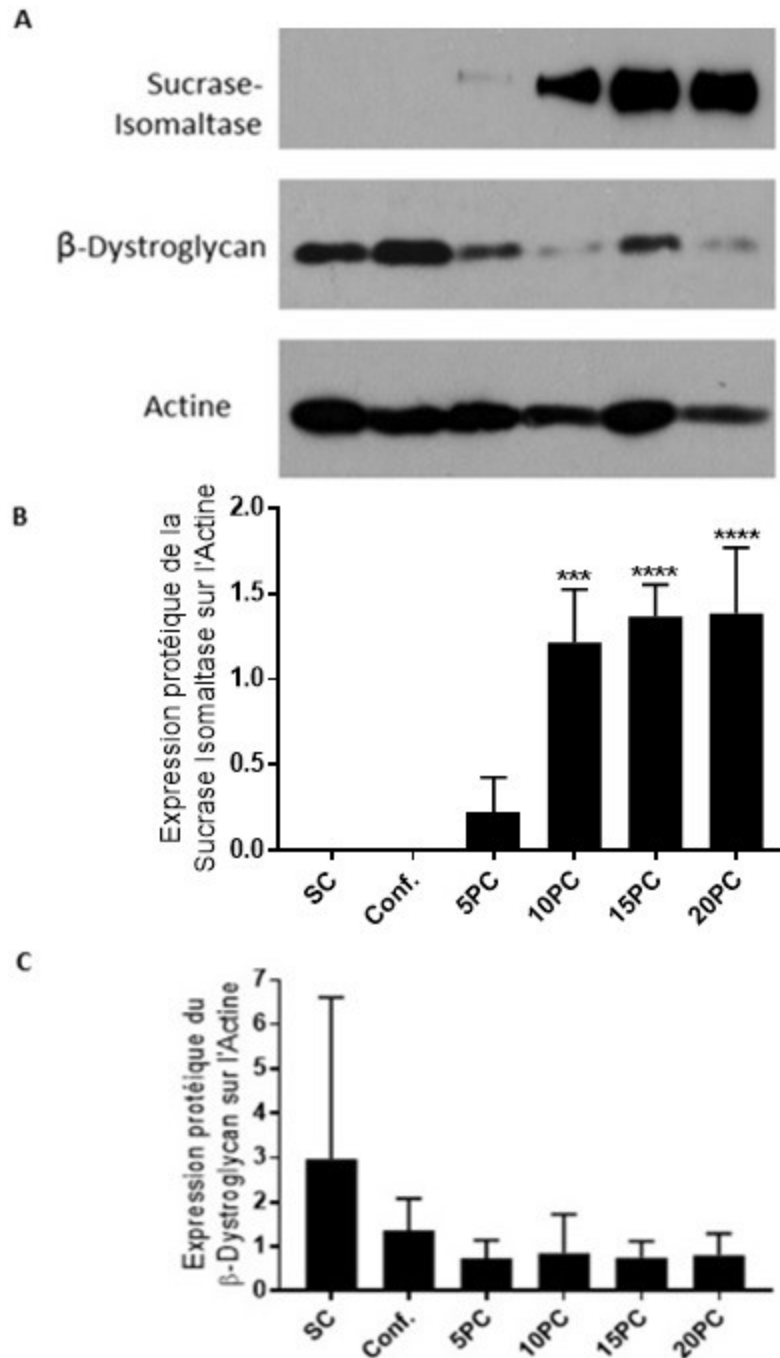


Figure 11: Expression protéique de β -dystroglycan et la sucrase isomaltase dans les cellules Caco-2/15.

L'expression protéique de la sucrase isomaltase, de β -dystroglycan et de l'actine a été analysée dans les cellules Caco-2/15 de la sous-confluence à 20 jours post-confluence (A). L'expression de la sucrase isomaltase (B) et de β -dystroglycan (C) a été exprimée relativement à la protéine de référence actine. L'expérience a été effectuée à trois reprises et la significativité des résultats a été calculée par rapport à la sous-confluence (SC) avec un test ANOVA pour un *p-value* inférieur à 0,05 (n=3). *** $P < 0.0005$, **** $p < 0.0001$

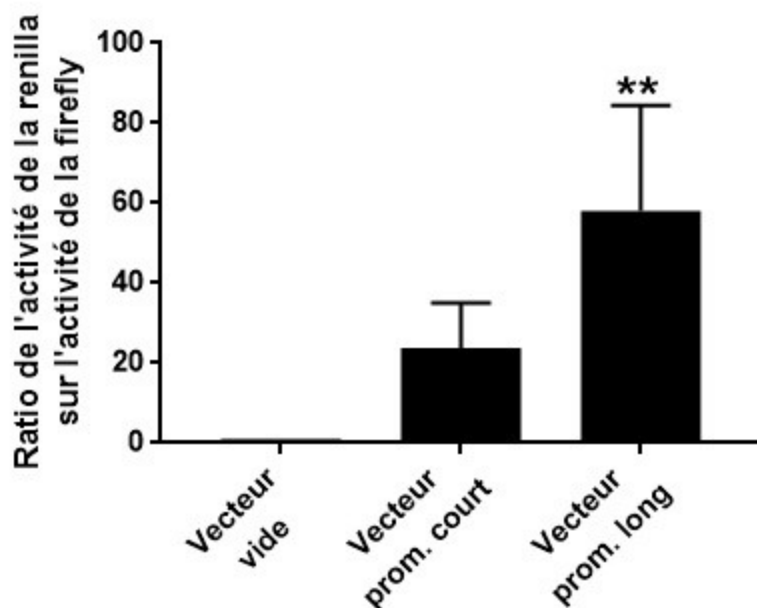


Figure 12: Évaluation de l'activité du promoteur de DAG1 par un essai luciférase dans les cellules HIEC.

Ratio de l'activité de la Renilla Luciférase sur l'activité de la Firefly Luciférase dans les cellules HIEC transfectées avec un vecteur vide, un vecteur contenant le promoteur court (198pb) et un vecteur contenant le promoteur long (842pb). La significativité des résultats a été calculée par rapport au vecteur vide avec un test ANOVA pour un *p-value* inférieur à 0,05 (n=3). ** $P < 0.01$

3.5 Abolition de l'expression de dystroglycan dans les cellules HIEC via shARN.

Pour les études d'abolition de l'expression de dystroglycan, cinq shARN différents ont été utilisés. Dans un premier temps, les cellules HIEC contenant les différents shARN ciblant dystroglycan ont été observées au microscope et comparées avec des cellules HIEC contrôles (Figure 13 A à F). Des différences phénotypiques ont été observées entre les différents shARN lorsque comparés aux cellules HIEC contrôles. Les cellules HIEC contrôles (A) ont une forme plutôt allongée et non-polarisée. Les cellules HIEC sh1 (B) semble avoir peu de différences avec les cellules HIEC contrôles (A) à l'exception de quelques cellules qui sont de formes arrondies. Les cellules HIEC sh2 (C) et sh3 (D) sont plus petites, très arrondies et ont de petits filaments extérieurs. Les cellules HIEC sh4 (E) ont un phénotype alternatif; c'est-à-dire qu'une partie des cellules dans le champ ressemble aux cellules HIEC contrôles (A) alors que certaines autres cellules ont un phénotype semblable aux cellules HIEC sh2 (C) et sh3 (D). Les cellules HIEC sh5 (F) ont un phénotype pratiquement identique aux cellules HIEC contrôles (A).

Les cellules HIEC contenant les différents shARN ciblant dystroglycan ont été analysées par immunobuvardage de type western. La validation de ces différents shARN a été effectuée en évaluant l'expression de β -dystroglycan. L'expression de β -dystroglycan a été exprimée relativement à la protéine de référence actine (Figure 14). La validation a été effectuée sur deux séries de cellules HIEC contenant les différents shARN contre dystroglycan (une seule de ces séries est présente à la figure 14). La série montrée à la Figure 14 ne contient pas les cellules HIEC sh1. Celui-ci avait une bonne diminution d'expression de β -dystroglycan, mais n'a pas été conservé. Les cellules HIEC sh2 et sh3 montre une très forte diminution d'expression de β -dystroglycan. Les cellules HIEC sh4 ont une diminution partielle d'expression de β -dystroglycan. Les cellules HIEC sh5 n'ont pas de baisse d'expression de β -dystroglycan lorsque comparée aux cellules HIEC contrôles shLuciférase (sh-Luc). La luciférase n'étant pas présente dans les cellules HIEC, le shLuc n'affecte pas le phénotype cellulaire ce qui en fait un bon contrôle.

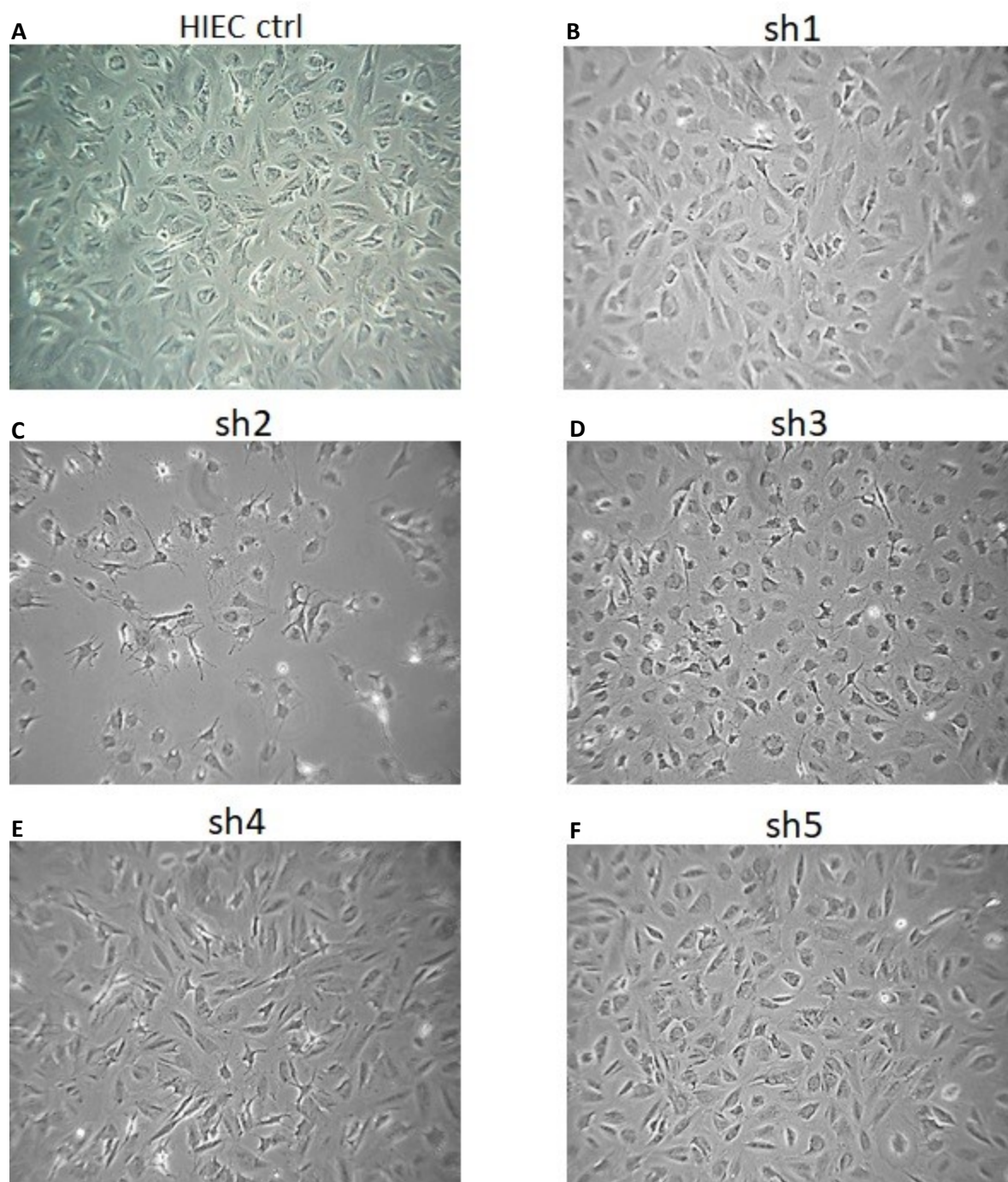


Figure 13: Abolition de l'expression de dystroglycan dans les cellules HIEC via shARN.
Phénotype des cellules HIEC contrôles (A), sh1 (B), sh2 (C), sh3 (D), sh4 (E) et sh5 (F).

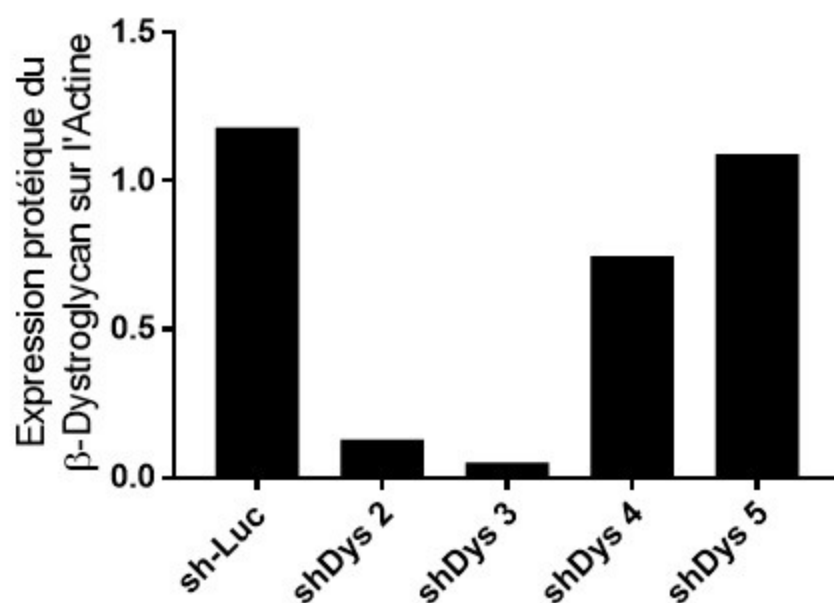


Figure 14: Validation de la régulation négative de dystroglycan dans les cellules HIEC.

La régulation négative de dystroglycan via les différents shARN a été validée par immunobuvardage de type western. L'expression de β -dystroglycan a été exprimée relativement à la protéine de référence actine dans les cellules HIEC shLuciférase (sh-Luc), shDys2, shDys3, shDys4 et shDys5.

3.6 Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la prolifération des cellules HIEC.

La prolifération cellulaire a été évaluée de deux façons. Premièrement, un décompte cellulaire a été fait à différents temps (24h, 96h et 144h) sur les cellules HIEC sh2, sh3 et sh5 (Figure 15 A). Après 144h, les cellules HIEC sh2 et sh3 sont au nombre approximatif de 600 000 et 800 000 cellules respectivement. Les cellules HIEC sh5 sont au nombre approximatif de 2,5 millions de cellules. L'expérience a été effectuée à trois reprises et la significativité des résultats a été calculée à 144h (Figure 15 B) avec un ANOVA pour un *p-value* inférieur à 0,05.

Deuxièmement, le pourcentage d'incorporation de BrdU a été calculé pour les cellules HIEC sh2, sh3 et sh5 à 120h (Figure 16). Les cellules HIEC sh2 et sh3 ont une incorporation de BrdU approximative de 18% et 20% respectivement. Les cellules HIEC sh5 ont une incorporation de BrdU approximative de 32%. L'expérience a été effectuée à trois reprises et la significativité des résultats a été calculée avec un ANOVA pour un *p-value* inférieur à 0,05.

3.7 Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la migration des cellules HIEC.

La migration des cellules HIEC a été étudiée via un test de cicatrisation. Les résultats sont exprimés en pourcentage de surface couverte par les cellules selon le temps en heures. Les deux premiers tests ont été effectués sur des cellules HIEC sh2 et sh5 sans inhibition de la prolifération cellulaire (Figure 17 A et B). Les deuxièmes tests ont été effectués sur des cellules HIEC sh2 et sh5 en présence d'hydroxyurée 2mM pour l'inhibition de la prolifération cellulaire (Figure 18 A et B). En absence d'inhibition de la prolifération, les cellules HIEC sh2 et sh5 ont eu besoin de 96h et 72h respectivement lors de la première expérience (Figure 17 A) et de 72h et moins de 48h respectivement lors de la deuxième expérience (Figure 17 B) pour recouvrir la surface. Lors de l'inhibition de la prolifération, les cellules HIEC sh2 et sh5 ont eu besoin de 72h et 48h respectivement lors de la première expérience (Figure 18 A) et 48h chacun lors de la deuxième expérience (Figure 18 B) pour recouvrir la surface.

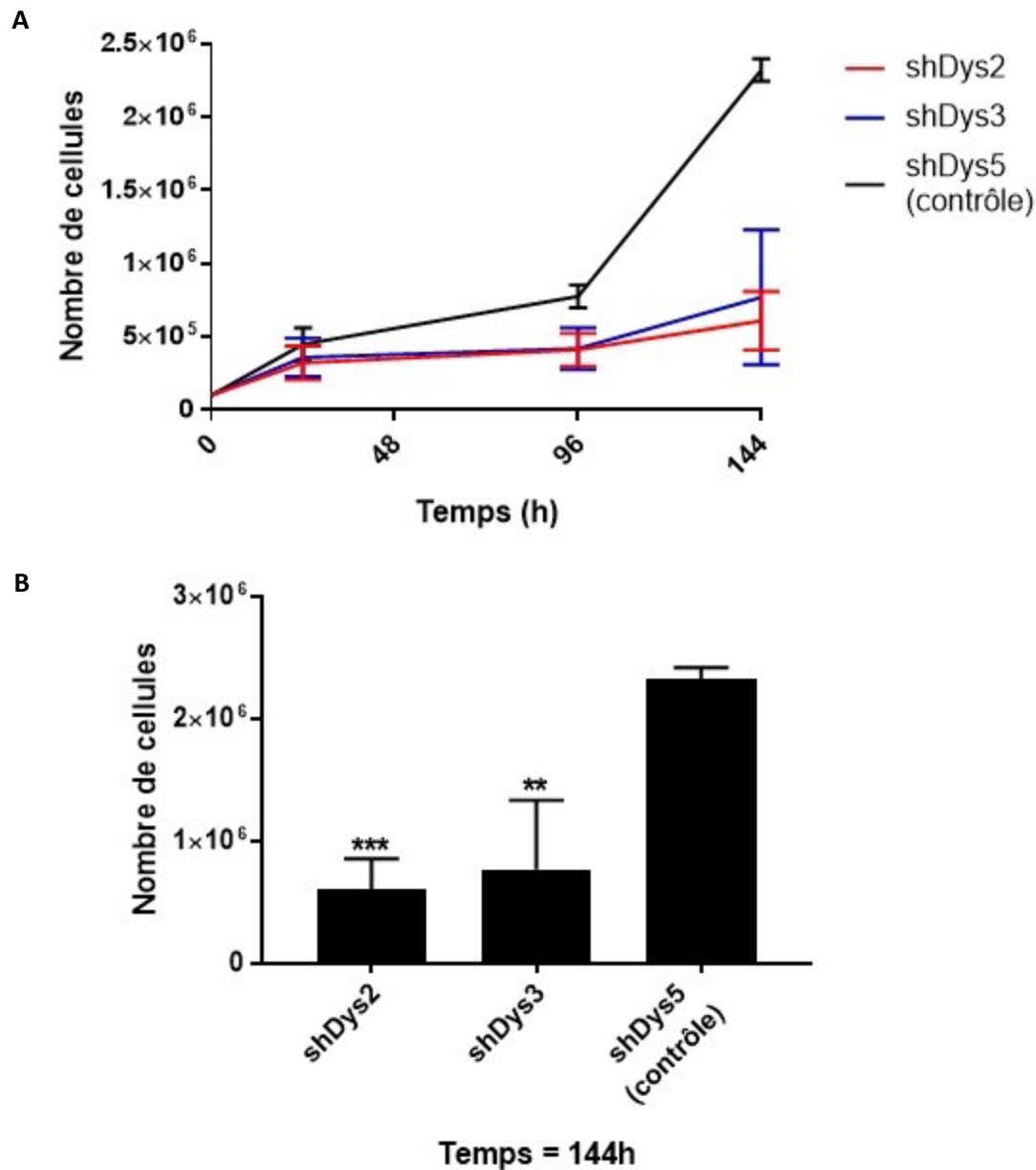


Figure 15: Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la prolifération des cellules HIEC via une courbe de prolifération.

La prolifération cellulaire a été étudiée en comptant le nombre de cellules HIEC sh2, sh3 et sh5 dans le temps. Une comparaison statistique du nombre de cellules dans les divers échantillons a été calculée au temps 144h. L'expérience a été effectuée à trois reprises et la significativité des résultats a été calculée à 144h avec un ANOVA pour un *p-value* inférieur à 0,05 (n=3). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

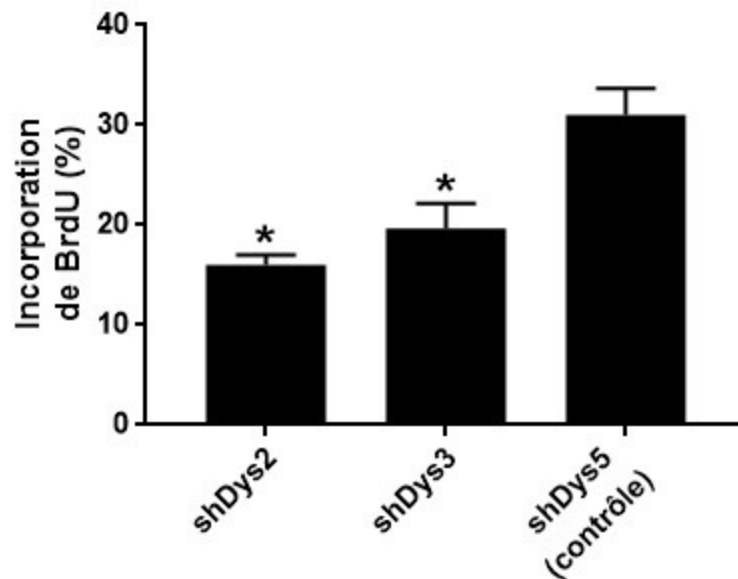


Figure 16: Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la prolifération des cellules HIEC via l'incorporation de BrdU

La prolifération cellulaire a été étudiée en comptant le pourcentage d'incorporation de BrdU à 120h dans les cellules HIEC sh2, sh3 et sh5. L'expérience a été effectuée à trois reprises et la significativité (*) des résultats a été calculée avec un ANOVA pour un *p-value* inférieur à 0,05 (n=3). * $P < 0.05$

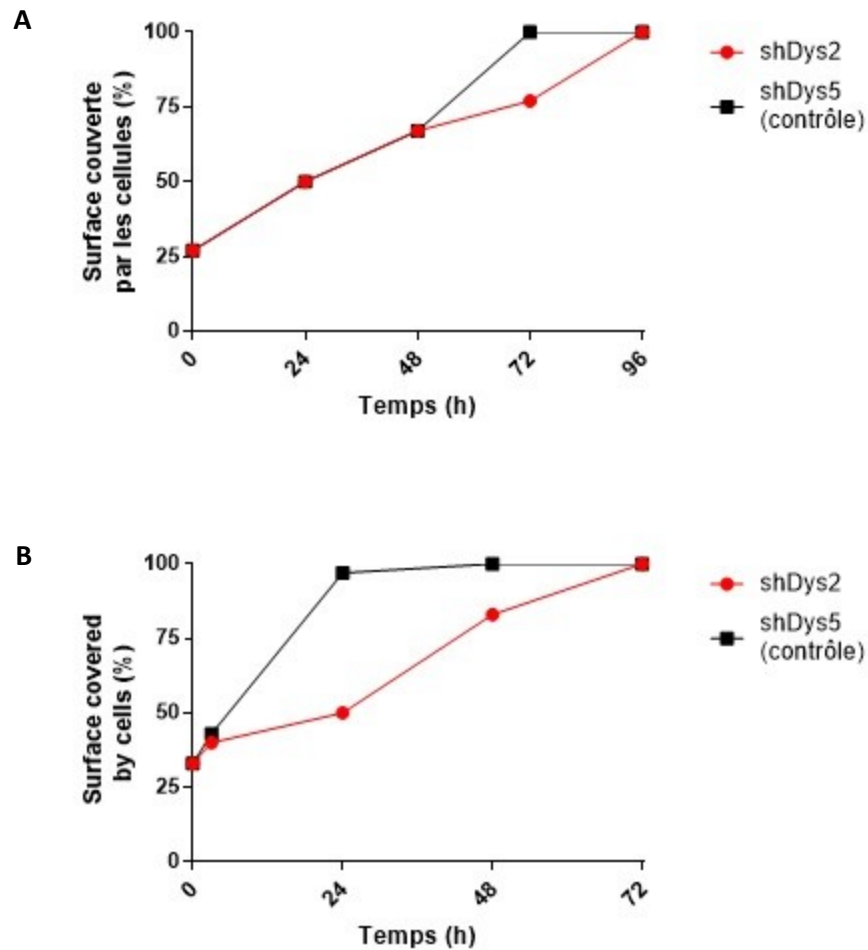


Figure 17: Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la migration des cellules HIEC sans inhibition de la prolifération.

La migration cellulaire a été étudiée via un test de cicatrisation. L'expérience a été effectuée à deux reprises et est calculée en termes de pourcentage de surface couverte par les cellules HIEC sh2 et sh5 dans le temps pour chaque expérience (n=2).

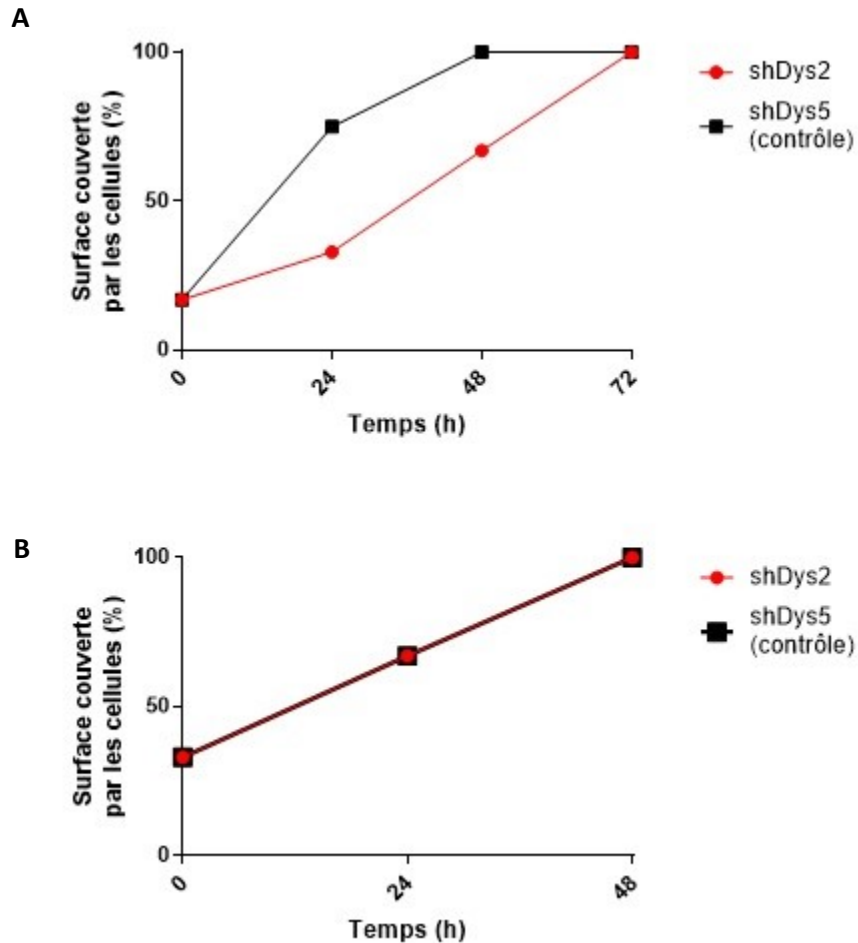


Figure 18: Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la migration des cellules HIEC avec inhibition de la prolifération.

La migration cellulaire a été étudiée via un test de cicatrisation avec hydroxyurée. L'expérience a été effectuée à deux reprises et est calculée en termes de pourcentage de surface couverte par les cellules HIEC sh2 et sh5 dans le temps pour chaque expérience (n=2).

3.8 Effet de la régulation négative de β -dystroglycan sur la survie des cellules HIEC.

Dans le but de déterminer s'il y avait présence ou non de mort cellulaire, le test du clivage du PARP a été utilisé. Quatre séries de cellules HIEC sh2, sh3 et sh5 ont été utilisées. Une seule série est présentée dans les résultats. L'expression de la protéine PARP, de β -dystroglycan et de l'actine ont été observée (Figure 19). L'expression de la protéine PARP est retrouvée à 116 kDa, alors qu'aucune bande n'est visible à 89 kDa. L'expression de β -dystroglycan est visible uniquement dans les cellules HIEC sh5.

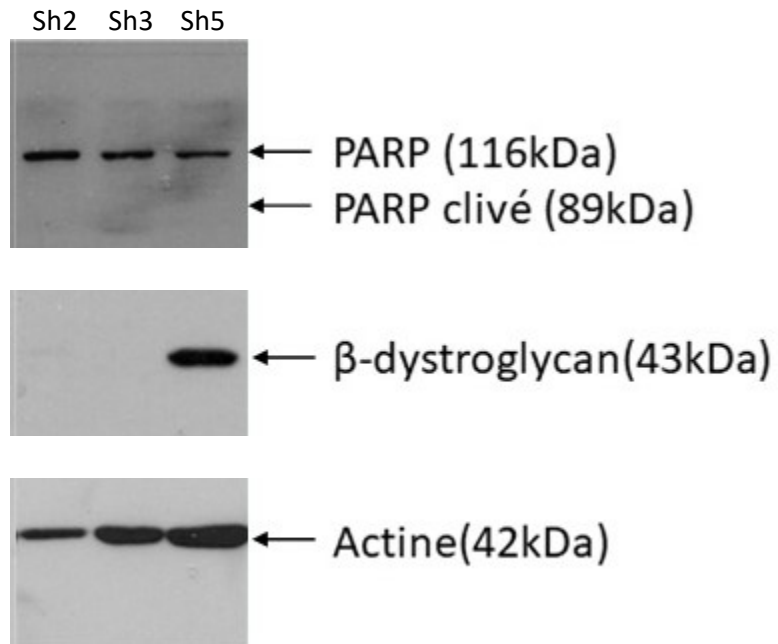


Figure 19: Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la survie des cellules HIEC.
La survie cellulaire a été étudiée en regardant l'expression de la protéine PARP par immunobuvardage dans les cellules HIEC sh2, sh3 et sh5.

4. DISCUSSION

4.1 Localisation de β -dystroglycan dans l'iléon fœtal et adulte.

D'abord dans l'iléon fœtal de 19 semaines, il est possible d'observer le β -dystroglycan dans la moitié inférieure de la crypte au même endroit qu'est exprimée la laminine-2 à ce stade du développement (Teller et al. 2007). Ensuite dans l'iléon adulte, β -dystroglycan se trouve à être exprimé dans le tiers inférieur de la crypte intestinale tout comme la laminine-2 chez l'adulte (Teller and Beaulieu 2001). Puisque la laminine-2 est l'un des ligands favoris du dystroglycan, il est normal de les voir exprimés au même endroit (Michele and Campbell 2003). De plus, il est possible d'observer le β -dystroglycan dans le muscle lisse autant dans le tissu fœtal que le tissu adulte. Cela s'explique par le fait qu'il y a présence de dystroglycan dans les muscles (Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992). Ces résultats montrent que dystroglycan serait associé aux cellules indifférenciées et prolifératives et/ou aux cellules de Paneth puisque ces deux types sont localisées dans la partie inférieure de la crypte intestinale (Roostae et al. 2016).

4.2 Expression de l'ARN messager et de la protéine β -dystroglycan dans les cellules HIEC.

L'expression d'ARN messager et de la protéine de β -dystroglycan a été analysée dans les cellules HIEC à différents stades de confluences. Chez ces cellules, l'expression du dystroglycan varie peu de la sous-confluence à 20 jours post-confluence. Il est important de savoir qu'à l'atteinte de la confluence, les cellules HIEC cessent de proliférer, mais ne se différencient pas (Perreault and Beaulieu 1996). Donc, les cellules HIEC sont indifférenciées indépendamment de leur stade de confluence. Cela suggère que le dystroglycan pourrait être exprimé seulement dans les cellules indifférenciées. Cela concorde en effet avec la localisation du β -dystroglycan dans le tiers inférieur de la crypte intestinale où l'on retrouve les cellules indifférenciées de l'épithélium intestinal (Roostae et al. 2016). De plus, il a été montré que les cellules HIEC expriment les laminines $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$ au niveau de l'ARNm. Par contre, lorsque cultivées sur une couche de cellules stromales confluentes, les cellules HIEC déposent peu ou pas (sous le seuil de détection)

de laminines $\alpha 2$ et $\alpha 3$, alors que l'expression et la déposition de laminines $\alpha 5$ à l'intervalle stroma-épithélium peut être observées (Teller et al. 2007). Donc, l'expression de dystroglycan dans les cellules HIEC n'est pas influencé par la présence de son ligand principal, la laminine-2 (chaîne $\alpha 2$).

4.3 Expression de l'ARN messager et de la protéine β -dystroglycan dans les cellules Caco-2/15.

L'expression d'ARN messager et de la protéine de β -dystroglycan a été analysée dans les cellules Caco-2/15. Ces cellules sont particulières puisqu'à l'atteinte de la confluence, elles arrêtent de proliférer et entament un processus de différenciation (Beaulieu J. F. and Quaroni 1991). Afin de déterminer si une série d'échantillons de cellules Caco-2/15 s'est bien différenciée, la sucrase isomaltase est utilisée. La sucrase isomaltase est un marqueur de différenciation terminale, son expression chez les cellules Caco-2/15 augmente avec la confluence/différenciation de ces cellules.

Les résultats obtenus montrent une absence d'expression de la sucrase isomaltase à sous-confluence et confluence, ce qui indique qu'à ce stade de confluence les cellules sont encore indifférenciées. Puis l'expression de la sucrase isomaltase augmente graduellement entre 5 et 20 jours post-confluence, ce qui signifie que les cellules sont en processus de différenciation et ce autant au niveau de l'ARNm que de la protéine. À l'inverse, les résultats montrent une plus forte expression du dystroglycan à sous-confluence et une diminution de cette expression à 5, 10, 15 et 20 jours post-confluence. Ces résultats sont significatifs au niveau de l'ARNm, mais pas de la protéine. La significativité des résultats est calculée par comparaisons multiples sur le résultat à sous-confluence et celui-ci a un très grand écart-type au niveau de la protéine ce qui peut expliquer l'impossibilité d'atteindre un *p-value* inférieur à 0,05. Il faudrait analyser d'autres séries de cellules Caco-2/15 afin de diminuer l'écart-type.

De plus, lorsque les cellules Caco-2/15 atteignent un état différencié, elles expriment les laminines $\alpha 3$ et $\alpha 5$ au niveau de l'ARNm et lorsque cultivées sur une couche de cellules stromales

confluentes, il est possible de détecter ces mêmes laminines à l'interface épithélium/stroma. Par contre, la laminine $\alpha 2$ n'est pas exprimée par ce type cellulaire (Teller et al. 2007). Cela concorde avec les résultats mentionnés précédemment et laisse croire que le dystroglycan serait associé aux cellules indifférenciées et prolifératives présentes dans la partie inférieure des cryptes intestinales.

4.4 Évaluation de l'activité du promoteur de DAG1 par un essai luciférase dans les cellules HIEC.

Les facteurs d'activation responsables de la transcription du gène DAG1 ne sont pas connus de la communauté scientifique. Il a donc été intéressant d'investiguer le promoteur du gène de dystroglycan afin de trouver les différentes séquences consensus qui le compose. Malheureusement, lorsque l'on observe le promoteur complet, un trop grand nombre de séquences consensus de différents facteurs de transcription y sont retrouvés. La stratégie a donc été de cloner un promoteur court et un promoteur long commençant tous deux au même endroit sur le promoteur complet, mais se terminant à des endroits différents. Puis, par un essai luciférase, il a été possible d'observer que le vecteur vide a une activité de 1 puisqu'il s'agit de notre contrôle, le vecteur contenant le promoteur court a une activité d'environ 20 et le vecteur contenant le promoteur long a une activité d'environ 60. Ces résultats montrent que la séquence longue de 842 paires de base a une activité significativement plus élevée par rapport au vecteur vide, mais pas la séquence courte de 198 paires de base. Cela suggère qu'il faut un promoteur suffisamment long pour avoir une activation optimale du gène DAG1. Bien que le promoteur court ait une activation plus élevée que le vecteur vide, cette différence n'est pas significative et suggère que le promoteur court n'est pas suffisant pour une activation optimale du gène DAG1.

Le programme MatInspector de Genomatix permet de trouver les séquences consensus de facteurs de transcription sur des séquences de promoteurs (Cartharius et al. 2005). J'ai utilisé ce programme sur le promoteur long et près de 2000 séquences consensus ont été identifiées. Parmi celles-ci, plusieurs ont été éliminées par le logiciel lui-même puisque ces séquences interféraient parfois avec d'autres motifs contenus dans le promoteur. De plus, une bonne partie

de ces facteurs de transcription ne sont pas reconnus pour être exprimés dans l'épithélium intestinal. Cette dernière information a pu être validée avec l'interface web TISSUES (Santos et al. 2015). J'ai, de plus, vérifié la présence des facteurs de transcription les plus connus de l'épithélium intestinal en me fiant à l'article de (Richmond and Breault 2010). Certains d'entre eux, comme SOX9 et Cdx1, ont leur séquence consensus reconnue sur le promoteur long. Je n'ai sélectionné que quelques facteurs de transcription, soit Smad4, E2F4 et HNF4 α en plus de SOX9 et Cdx1, qui pourront être testés prochainement dans le laboratoire avec un essai luciférase afin de valider leur intervention dans la régulation de l'expression du dystroglycan.

Smad4 est un facteur de transcription ainsi qu'un suppresseur de tumeur impliqué dans le cancer colorectal (Chow and Macrae 2005). La perte d'expression de Smad4 est synonyme de mauvais pronostic pour les patients atteints de cancer colorectal (D. Stover 2018) et des mutations de Smad4 ont été identifiées dans 20 à 30% de tous les cancers colorectaux (Jung et al. 2017). De plus, la perte de Smad4 corrèle avec la perte d'E-cadhérine (Jung et al. 2017) alors qu'une perte de fonction de dystroglycan réduit l'expression d'E-cadhérine au niveau des contacts intercellulaires durant la morphogenèse de la peau (Sirour et al. 2011). Finalement, Smad4 et la signalisation des Wnt médient l'interaction entre les voies de signalisation du TGF β (Transforming Growth Factor Bêta) et des BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) ce qui est important pour l'homéostasie intestinale et la carcinogenèse (Jung et al. 2017).

E2F4 est un important répresseur du cycle cellulaire bien que l'absence de cette protéine dans certains types tissulaires diminue tout de même la prolifération cellulaire et la réplication d'ADN. Dans les cellules HIEC, la délétion d'E2F4 diminue la prolifération cellulaire et entraîne une régulation négative des cibles des autres protéines E2F. De plus, E2F4 est fortement exprimé au niveau de la zone proliférative de la crypte intestinale (Hsu and Sage 2016).

HNF4 α est connu pour avoir un rôle fonctionnel sur les jonctions épithéliales et la prolifération cellulaire au niveau du pancréas, des reins, de l'estomac et de l'intestin. De plus, HNF4 α est important pour la différenciation optimale des cellules épithéliales intestinales ce qui en fait un régulateur important de l'homéostasie intestinale chez la souris adulte (Babeu and Boudreau 2014).

SOX9 est retrouvé dans le tiers inférieur de la crypte intestinal et est exprimé dans le noyau des cellules souches et des cellules de Paneth ainsi que certaines cellules de la zone de transition. Sox9 est un répresseur de différenciation, en absence de cette protéine une augmentation de la prolifération cellulaire peut être observée au niveau de l'épithélium intestinal murin (Jo et al. 2014). Chez la souris, SOX9 est important pour la différenciation des cellules de Paneth puisqu'en absence de cette protéine l'intestin n'a aucune cellules de Paneth alors que le nombre de cellules caliciformes et entéroendocrines restent inchangées (Mori-Akiyama et al. 2007). De plus, SOX9 peut contrôler la capacité proliférative des cellules souches intestinales (Roche et al. 2015).

Cdx1 est un facteur de transcription présent dans la crypte intestinale et dont l'expression diminue au niveau de la villosité. Chez l'adulte, Cdx1 se chevauche avec Cdx2 pour la régulation de l'homéostasie intestinale (Grainger et al. 2013). De plus, Cdx1 et Cdx2 sont des suppresseurs de tumeurs. Par contre la perte d'expression de ces deux protéines est nécessaire pour qu'un impact significatif soit observé sur la progression tumorale au niveau de l'intestin murin (Hryniuk et al. 2014). Finalement, il a été montré que les facteurs de transcription des groupes HNF et Cdx peuvent moduler la prolifération des cellules HIEC et peuvent initier le programme de différenciation des cellules absorbantes (Benoit et al. 2010).

4.5 Abolition de l'expression de dystroglycan dans les cellules HIEC via shARN.

Les résultats présentés précédemment suggèrent que le dystroglycan est exprimé dans les cellules indifférenciées de la crypte intestinale. Les deux fonctions fondamentales de ces cellules sont la prolifération et la migration (Benoit et al. 2009). De plus, il est connu que les interactions entre la MEC et la cellule médiées par les intégrines (récepteurs aux laminines) sont responsables de fonctions cellulaires importantes telles que la prolifération, la migration, la différenciation et la survie cellulaire (Benoit et al. 2012). Dystroglycan, étant un récepteur aux laminines de type non-intégrines, pourrait avoir un rôle similaire à celles-ci puisqu'il est aussi responsable de l'interaction entre la MEC et la cellule. Il serait possible que tout comme les intégrines, dystroglycan aurait des effets importants sur la prolifération, migration, différenciation et survie cellulaire via son attachement aux laminines.

Afin d'identifier les rôles de dystroglycan dans les cellules de l'épithélium intestinal, des shARN ciblant cette protéine ont été utilisés sur les cellules HIEC. Cinq shARN différents ont été testés. D'abord, en regardant les cellules au microscope, il a été possible de noter des différences majeures entre les shARN étudiés. Les cellules infectées avec les sh2 et sh3 avaient le phénotype le plus distant des cellules HIEC normales. Ces deux shARN ont donc été choisis comme phénotype fort. Les cellules contenant les sh1 et sh4 montraient plutôt un phénotype ambivalent. Ces deux shARN n'ont donc pas été retenus pour les expériences. Les cellules avec sh5, quant à elles, avaient le phénotype le plus semblable aux cellules HIEC normales. Ce shARN a donc été conservé comme contrôle.

Afin de valider les phénotypes observés sur les cellules HIEC infectées avec les différents shARN contre dystroglycan, l'expression protéique de β -dystroglycan a aussi été étudiée. Les résultats obtenus concordaient parfaitement avec les phénotypes préalablement observés. Il y avait une importante baisse d'expression de β -dystroglycan dans les cellules sh2 et sh3, une faible baisse d'expression dans les cellules sh4 et aucune différence d'expression entre les cellules sh5 et le contrôle. C'est pourquoi uniquement les cellules avec sh2, sh3 et sh5 ont été utilisées dans les expériences suivantes.

4.6 Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la prolifération des cellules HIEC.

Avec les shARN ciblant dystroglycan préalablement déterminés, il a été possible d'étudier les effets de la perte d'expression du dystroglycan sur la prolifération cellulaire dans les cellules HIEC. Deux tests ont été utilisés, soit de faire une courbe de prolifération ainsi que calculer le pourcentage d'incorporation de BrdU.

D'abord la courbe de prolifération a montré une importante différence dans la quantité de cellules entre les cellules sh2 et sh3 comparés aux cellules sh5. Après 6 jours d'incubation, les cellules sh2 et sh3 étaient au nombre approximatif de 600 000 et 800 000 cellules respectivement alors que les cellules sh5 étaient au nombre approximatif de 2,5 millions de cellules. Il s'agit d'une diminution significative de la prolifération cellulaire pour les cellules HIEC sh2 et sh3 comparativement aux cellules HIEC sh5. Il semblerait donc que la perte d'expression du dystroglycan affecterait négativement la prolifération des cellules HIEC.

Ensuite, le pourcentage d'incorporation de BrdU a montré des résultats similaires à ceux de la courbe de prolifération. Une baisse significative de l'incorporation du BrdU a été observée pour les cellules sh2 et sh3 par rapport aux cellules sh5. Cela confirmerait que le dystroglycan aurait un rôle important à jouer sur la prolifération cellulaire.

Ces résultats sont en accord avec la littérature scientifique où il a été montré que dystroglycan avait un rôle sur la croissance cellulaire dans les cellules épithéliales du sein (Muschler et al. 2002). Par contre, Schröder et al. 2007 ont montré que la perte de dystroglycan causait de l'hyperprolifération chez les cellules souches neurales. Une chose paraît certaine, dystroglycan semble influencer la prolifération des cellules épithéliales que ce soit positivement ou négativement. De plus, ces résultats suggèrent un rôle pour dystroglycan similaire aux intégrines dans le cadre de l'interaction cellules-MEC (Benoit et al. 2012).

4.7 Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la migration des cellules HIEC.

La migration des cellules HIEC a été étudiée via un test de cicatrisation. Les premiers tests ont été effectués sur des cellules HIEC sh2 et sh5 sans inhibition de la prolifération cellulaire où les cellules HIEC sh2 et sh5 ont eu besoin de 96h et 72h respectivement lors de la première expérience et de 72h et moins de 48h respectivement lors de la deuxième expérience pour recouvrir la surface. Ce résultat suggère un ralentissement de la migration des cellules HIEC sh2 par rapport aux cellules HIEC sh5 (contrôle). Puisqu'il a précédemment été montré que l'absence du dystroglycan affectait la prolifération cellulaire, il se peut que ce résultat soit dû à un ralentissement de la prolifération et non de migration.

Les deux expériences suivantes ont été effectuées en présence d'hydroxyurée afin d'inhiber la prolifération et donc d'éliminer ce biais dans les résultats. Les cellules HIEC sh2 et sh5 ont eu besoin de 72h et 48h respectivement lors de la première expérience et 48h chacun lors de la deuxième expérience pour recouvrir la surface. Dans la première expérience, le résultat obtenu est semblable à ceux obtenus sans inhibition de prolifération. Par contre, la deuxième expérience ne montre aucune différence de vitesse de migration entre les cellules HIEC sh2 et sh5. De plus, la vitesse de migration semble être plus rapide en absence de prolifération chez les cellules HIEC sh2. Ce résultat est contradictoire et n'a pas d'explication pour le moment. Par contre, la vitesse de migration des cellules HIEC sh5 reste autour de 48h et ce résultat est en accord avec les résultats précédemment observés dans l'article de Gagné et al. 2010. Une troisième expérience sera nécessaire afin de vérifier si dystroglycan a un effet sur la migration des cellules HIEC.

Du côté de la littérature scientifique, une abolition de l'expression du dystroglycan n'a jamais été testé sur la migration cellulaire. Par contre, une étude de Palmieri et al. 2017 a utilisé une forme mutée, hypoglycosylée, d' α -dystroglycan. Selon cet article, la migration cellulaire passe par la réorganisation du cytosquelette d'actine via β -dystroglycan afin d'allonger les filopodes pour le déplacement de la cellule. Or, pour que ce déplacement s'effectue, les résultats de cette équipe de recherche suggèrent l'importance de la liaison d' α -dystroglycan au substrat de laminines. En présence d' α -dystroglycan hypoglycosylée, la liaison aux laminines est faible ce qui empêche le

processus d'élongation des filopodes et ralenti la migration cellulaire. Si l'on revient à mes résultats, il est normal qu'il y ait un ralentissement de la migration cellulaire chez les cellules HIEC sh2 comparé aux cellules HIEC sh5. Par contre, puisque les cellules HIEC sh2 n'expriment plus du tout de dystroglycan, il serait attendu qu'il y ait très peu de migration ou du moins que cette migration soit davantage ralentie par rapport aux cellules contrôles. Par contre, il faut tenir compte du fait que dystroglycan n'est pas le seul récepteur aux laminines présent dans les cellules HIEC. Les intégrine $\alpha 8 \beta 1$ (Benoit et al. 2009) et le récepteur 37/67LR (Khalfaoui et al. 2013) affectent tous deux la migration des cellules HIEC et pourrait substituer à dystroglycan.

4.8 Effet de l'abolition de l'expression de β -dystroglycan sur la survie des cellules HIEC.

Afin de s'assurer que l'effet négatif de la perte du dystroglycan sur la prolifération cellulaire n'est pas dû à de la mort cellulaire, un test de clivage du PARP a été effectué. En présence de mort cellulaire, la protéine PARP est clivée et une bande est alors visible à 89kDa suite à un immunobuvardage de type western. Parmi les 4 séries de cellules HIEC sh2, sh3 et sh5 testées, aucune ne montrait une bande correspondant à la protéine PARP à 89kDa. Une seule bande était visible à 116kDa, qui correspond au poids moléculaire de la protéine PARP non-clivée.

De plus, pour chacun des échantillons, l'expression protéique du β -dystroglycan a été vérifiée afin de s'assurer que les cellules ne produisaient plus du tout la protéine dystroglycan. En effet, l'expression de β -dystroglycan était seulement visible dans les cellules HIEC sh5. Ce résultat permet de montrer qu'il n'y a aucune mort cellulaire dans les cellules HIEC en absence du dystroglycan. Donc, le ralentissement de la prolifération cellulaire déterminé plus haut ne serait pas dû à de la mort cellulaire et suggère que les cellules HIEC se divisent beaucoup moins rapidement en absence du dystroglycan.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Tous ces résultats montrent que la protéine dystroglycan est exprimée dans les cellules prolifératives et indifférenciées de la crypte intestinale où elle a un effet important sur la prolifération et possiblement sur la migration cellulaire. Vu ses multiples fonctions dans les différents épithéliums du corps humain, beaucoup reste à découvrir sur le dystroglycan dans l'épithélium intestinal.

Premièrement, il sera intéressant de tester les différents facteurs de transcription identifiés précédemment en faisant des essais luciférase. Cela pourra aider à comprendre davantage pourquoi le dystroglycan est associé aux cellules indifférenciées plutôt qu'aux cellules différenciées.

Deuxièmement, il faudra faire plus de tests de migration afin de vérifier la tendance que la migration cellulaire puisse être ralentie par l'absence du dystroglycan. Puisque dystroglycan est une protéine d'ancrage à la matrice extracellulaire, il serait possible de s'attendre à ce qu'il contrôle la migration cellulaire dans l'épithélium intestinal.

Troisièmement, les shARN ciblé contre dystroglycan pourrait être utilisés dans les cellules Caco-2/15 afin de vérifier si la perte du dystroglycan pourrait avoir un effet sur la différenciation cellulaire. Puisque les cellules Caco-2/15 expriment de moins en moins de dystroglycan à mesure qu'elles se différencient, il serait possible de penser que dystroglycan a un rôle à jouer dans la différenciation de ces cellules.

Quatrièmement, tous les résultats effectués durant ce projet ont été fait en condition normale. Il pourrait être intéressant de voir l'expression du dystroglycan dans des tissus en conditions pathologiques (cancer colorectal) puisque dans les autres épithéliums, y compris le côlon, dystroglycan est souvent associé au cancer. De plus, il serait intéressant d'observer l'expression protéique d' α et β -dystroglycan dans différentes lignées cellulaires du cancer colorectal; d'un grade moins avancé jusqu'à un grade avec métastase.

6. REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous les étudiants du laboratoire (passés et présents) pour leur aide et leur support tout au long de ma maîtrise.

Au Pr. Jean-François Beaulieu pour m'avoir accepté dans son laboratoire dès mon premier stage et m'avoir donné ma chance. Merci pour ta confiance, ton support et ta compréhension face à mes nombreux problèmes de santé. J'ai eu beaucoup de plaisir lors de nos nombreuses sorties de groupe au chalet. Tu es un directeur de recherche exceptionnel.

À Elizabeth Herring et Éric Tremblay pour leur aide constante et leur compétence à régler chaque petit problème que j'avais dans le laboratoire. On ne peut espérer de meilleurs assistants de recherche.

À Blanche Senicourt qui a été une mentore dès mon premier stage et ce autant au laboratoire que dans ma vie personnelle. Merci pour ton aide et ta patience avec mes milliers de questions. Merci d'avoir rendu ces dernières années si agréable par ta présence et ton sens de l'humour. Big Love!

À Sepideh Fallah pour son support et l'entraide que nous nous sommes apportés. Merci d'avoir partagé un peu de ta culture avec moi. Nos discussions étaient toujours des plus intéressantes.

À Gabriel Cloutier aussi pour son support et l'entraide que nous nous sommes apportés. Merci pour toutes ces discussions politiques et culturelles toujours bien divertissantes.

À Clara Mancuso pour son support dans ma dernière année de maîtrise. Merci d'avoir partagé un peu de ton Italie avec nous en apportant une machine à expresso au bureau. J'ai eu bien du plaisir avec nos cours français-anglais-italien et nos sorties typiquement canadiennes.

À Salah Boudjadi pour tous ses précieux conseils en laboratoire. Tu es l'un des meilleurs étudiants que j'ai eu la chance de côtoyer. Merci de m'avoir transmis un peu de ton savoir.

À Mandy Malick pour toutes les belles discussions philosophiques et scientifiques que nous avons eu au laboratoire. Le temps passe tellement vite à tes côtés. Merci pour tous tes conseils professionnels et personnels.

Finalement, merci aux Professeures Véronique Moulin et Nathalie Perreault pour avoir accepté de réviser ce mémoire.

7. RÉFÉRENCES

- Akhavan A, Crivelli SN, Singh M, Lingappa VR, Muschler JL. 2008. SEA domain proteolysis determines the functional composition of dystroglycan. *The FASEB Journal* 22: 612-621.
- Allikian MJ, McNally EM. 2007. Processing and Assembly of the Dystrophin Glycoprotein Complex. *Traffic* 8: 177-183.
- Babeu J-P, Boudreau F. 2014. Hepatocyte nuclear factor 4- α involvement in liver and intestinal inflammatory networks. *World Journal of Gastroenterology* 20: 22.
- Banday M, Sameer A, Mir A, Mokhdomi TA, Chowdri NA, Haq E. 2016. Matrix metalloproteinase (MMP) - 2, -7 and -9 promoter polymorphisms in colorectal cancer in ethnic Kashmiri population — A case–control study and a mini review. *Gene* 589: 81-89.
- Barresi R, Campbell KP. 2006. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *Journal of Cell Science* 119: 199-207.
- Bastide P, et al. 2007. Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *The Journal of Cell Biology* 178: 635-648.
- Beaulieu, Ménard D. 2012. Isolation, Characterization, and Culture of Normal Human Intestinal Crypt and Villus Cells. *Methods in Molecular Biology* 806: 157-173.
- Beaulieu JF, Quaroni A. 1991. Clonal analysis of sucrase -isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *The Biochemical journal* 280 (Pt 3): 599-608.
- Benoit YD, Groulx J-F, Gagné D, Beaulieu J-F. 2012. RGD-Dependent Epithelial Cell-Matrix Interactions in the Human Intestinal Crypt. *Journal of Signal Transduction* 2012: 248759.
- Benoit YD, Lussier C, Ducharme PA, Sivret S, Schnapp LM, Basora N, Beaulieu JF. 2009. Integrin $\alpha 8 \beta 1$ regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK-dependent mechanism. *Biology of the Cell* 101: 695-708.
- Benoit YD, Paré F, Francoeur C, Jean D, Tremblay E, Boudreau F, Escaffit F, Beaulieu J-FF. 2010. Cooperation between HNF-1 α , Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 298: 17.
- Bozzi M, Morlacchi S, Bigotti M, Sciandra F, Brancaccio A. 2009. Functional diversity of dystroglycan. *Matrix Biology* 28: 179-187.
- Brennan PA, Jing J, Ethunandan M, Górecki D. 2004. Dystroglycan complex in cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 30: 589-592.

Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21: 2933-2942.

Chen Y-JJ, Spence HJ, Cameron JM, Jess T, Ilesley JL, Winder SJ. 2003. Direct interaction of beta-dystroglycan with F-actin. *The Biochemical journal* 375: 329-337.

Chow E, Macrae F. 2005. A review of Juvenile Polyposis Syndrome. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 20: 1634-1640.

Coco C, et al. 2012. Increased expression of CD133 and reduced dystroglycan expression are strong predictors of poor outcome in colon cancer patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 31: 1-10.

Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews Genetics* 7.

D. Stover JS, T. Freeman, E. Chan. 2018. SMAD4 in Colorectal Cancer. *My Cancer Genome*
de Bernabé D, Inamori K-i, Yoshida-Moriguchi T, Weydert CJ, Harper HA, Willer T, Henry MD, Campbell KP. 2009. Loss of α -Dystroglycan Laminin Binding in Epithelium-derived Cancers Is Caused by Silencing of LARGE. *Journal of Biological Chemistry* 284: 11279-11284.

Driss A, Charrier L, Yan Y, Nduati V, Sitaraman S, Merlin D. 2006. Dystroglycan receptor is involved in integrin activation in intestinal epithelia. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 290.

Durbeej M, Larsson E, Ibraghimov-Beskrovnaia O, Roberds SL, Campbell KP, Ekblom P. 1995. Non-muscle alpha-dystroglycan is involved in epithelial development. *The Journal of Cell Biology* 130: 79-91.

Dydensborg A, Herring E, Auclair J, Tremblay E, Beaulieu J-F. 2006. Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 290.

Endo T. 2015. Glycobiology of α -dystroglycan and muscular dystrophy. *The Journal of Biochemistry* 157: 1-12.

Ervasti JM, Campbell KP. 1993. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *The Journal of Cell Biology* 122: 809-823.

Gagné D, Groulx JF, Benoit YD, Basora N, Herring E, Vachon PH, Beaulieu JF. 2010. Integrin-linked kinase regulates migration and proliferation of human intestinal cells under a fibronectin-dependent mechanism. *Journal of Cellular Physiology* 222: 387-400.

Gazzerro E, Sotgia F, Bruno C, Lisanti MP, Minetti C. 2009. Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *European Journal of Human Genetics* 18: 137-145.

Gee SH, Montanaro F, Lindenbaum MH, Carbonetto S. 1994. Dystroglycan-alpha, a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell* 77: 675-686.

Grainger S, Hryniuk A, Lohnes D. 2013. Cdx1 and Cdx2 Exhibit Transcriptional Specificity in the Intestine. PLoS ONE 8.

Haenggi T, Fritschy MJ. 2006. Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. Cellular and Molecular Life Sciences 63: 1614-1631.

Hara Y, Balci-Hayta B, Yoshida-Moriguchi T, Kanagawa M, Bernabé D, Li H, Willer T, Satz JS, Crawford RW, Burden SJ. 2011. A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. New England Journal of Medicine 364: 939-946.

Henry MD, Campbell KP. 1998. A role for dystroglycan in basement membrane assembly. Cell 95: 859-870.

Hryniuk A, Grainger S, Savory JGA, Lohnes D. 2014. Cdx1 and Cdx2 Function as Tumor Suppressors. Journal of Biological Chemistry 289: 33343-33354.

Hsu J, Sage J. 2016. Novel Functions for the Transcription Factor E2F4 in Development and Disease. Cell Cycle.

Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix nature.

Jo A, et al. 2014. The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. Genes & Diseases 1: 149-161.

Jung B, Staudacher JJ, Beauchamp D. 2017. Transforming Growth Factor β Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. Gastroenterology 152: 36-52.

Khalfaoui T, Groulx J-F, Sabra G, GuezGuez A, Basora N, Vermette P, Beaulieu J-F. 2013. Laminin Receptor 37/67LR Regulates Adhesion and Proliferation of Normal Human Intestinal Epithelial Cells. PLoS ONE 8.

Losasso C, Tommaso F, Sgambato A, Ardito R, Cittadini A, Giardina B, Petrucci TC, Brancaccio A. 2000. Anomalous dystroglycan in carcinoma cell lines. FEBS Letters 484: 194-198.

Masaki T, Matsumura K. 2010. Biological Role of Dystroglycan in Schwann Cell Function and Its Implications in Peripheral Nervous System Diseases. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010: 740403.

Michele DE, Campbell KP. 2003. Dystrophin-Glycoprotein Complex: Post-translational Processing and Dystroglycan Function. Journal of Biological Chemistry 278: 15457-15460.

Miner JH. 2008. Laminins and their roles in mammals. Microscopy Research and Technique 71: 349-356.

Moore CJ, Winder SJ. 2012. The inside and out of dystroglycan post-translational modification. Neuromuscular Disorders 22: 959-965.

Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, Gao J, Boothman DA. 2014. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 24: 15-28.

Mori-Akiyama Y, van den Born M, van Es JH, Hamilton SR, Adams HP, Zhang J, Clevers H, de Crombrughe B. 2007. SOX9 Is Required for the Differentiation of Paneth Cells in the Intestinal Epithelium. *Gastroenterology* 133: 539-546.

Muschler J, Levy D, Boudreau R, Henry M, Campbell K, Bissell MJ. 2002. A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells. *Cancer research* 62: 7102-7109.

Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. 1998. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *The Journal of biological chemistry* 273: 33533-33539.

Palmieri V, Bozzi M, Signorino G, Papi M, De Spirito M, Brancaccio A, Maulucci G, Sciandra F. 2017. α -Dystroglycan hypoglycosylation affects cell migration by influencing β -dystroglycan membrane clustering and filopodia length: A multiscale confocal microscopy analysis. *Biochimica et biophysica acta* 1863: 2182-2191.

Parker A, Maclaren OJ, Fletcher AG, Muraro D, Kreuzaler PA, Byrne HM, Maini PK, Watson AJ, Pin C. 2017. Cell proliferation within small intestinal crypts is the principal driving force for cell migration on villi. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31: 636-649.

Peng H, Al iA, Daggett D, Rauvala H, Hassell J, Smalheiser N. 1998. The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction. *Cell Adhes Commun.:* 475-489.

Perreault N, Beaulieu JF. 1996. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Experimental cell research* 224: 354-364.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29.

Rezniczek GA, Konieczny P, Nikolic B, Reipert S, Schneller D, Abrahamsberg C, Davies KE, Winder SJ, Wiche G. 2007. Plectin 1f scaffolding at the sarcolemma of dystrophic (mdx) muscle fibers through multiple interactions with β -dystroglycan. *The Journal of Cell Biology* 176: 965-977.

Richmond CA, Breault DT. 2010. Regulation of gene expression in the intestinal epithelium. *Progress in molecular biology and translational science* 96: 207-229.

Roche KC, Gracz AD, Liu X, Newton V, Akiyama H, Magness ST. 2015. SOX9 Maintains Reserve Stem Cells and Preserves Radioresistance in Mouse Small Intestine. *Gastroenterology* 149: 1553-614009856.

Roostae A, Benoit YD, Boudjadi S, Beaulieu JF. 2016. Epigenetics in Intestinal Epithelial Cell Renewal. *Journal of Cellular Physiology* 231: 2361-2367.

Russo K, Stasio DE, Macchia G, Rosa G, Brancaccio A, Petrucci TC. 2000. Characterization of the beta-dystroglycan-growth factor receptor 2 (Grb2) interaction. *Biochemical and biophysical research communications* 274: 93-98.

Santos A, Tsafou K, Stolte C, Pletscher-Frankild S, O'Donoghue SII, Jensen LJ. 2015. Comprehensive comparison of large-scale tissue expression datasets. *PeerJ* 3.

Sato S, et al. 2008. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nature Neuroscience* 11: 923-931.

Schröder JEE, Tegeler MR, Grosshans U, Porten E, Blank M, Lee J, Esapa C, Blake DJ, Kröger S. 2007. Dystroglycan regulates structure, proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the developing vertebrate CNS. *Developmental biology* 307: 62-78.

Sgambato A, Migaldi M, Montanari M. 2003. Dystroglycan expression is frequently reduced in human breast and colon cancers and is associated with tumor progression. *American Journal of Pathology* 162: 849-860.

Shang Z, Ethunandan M, Górecki DC, Brennan PA. 2008. Aberrant expression of β -dystroglycan may be due to processing by matrix metalloproteinases-2 and -9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 44: 1139-1146.

Sirour C, Hidalgo M, Bello V, Buisson N, Darribère T, Moreau N. 2011. Dystroglycan is involved in skin morphogenesis downstream of the Notch signaling pathway. *Molecular biology of the cell* 22: 2957-2969.

Sotgia F, Lee H, Bedford MT, Petrucci T, Sudol M, Lisanti MP. 2001. Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins. *Biochemistry* 40: 14585-14592.

Sugita S, Saito F, Tang J, Satz J, Campbell K, Südhof TC. 2001. A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. *The Journal of Cell Biology* 154: 435-446.

Teller, Beaulieu J-F. 2001. Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 3: 1-18.

Teller, Auclair J, Herring E, Gauthier R, Ménard D, Beaulieu J-F. 2007. Laminins in the developing and adult human small intestine: Relation with the functional absorptive unit. *Developmental Dynamics* 236: 1980-1990.

Thomas JO, Kornberg RD. 1975. An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72: 2626-2630.

Thompson O, Moore CJ, Hussain S-A, Kleino I, Peckham M, Hohenester E, Ayscough KR, Saksela K, Winder SJ. 2010. Modulation of cell spreading and cell-substrate adhesion dynamics by dystroglycan. *Journal of Cell Science* 123: 118-127.

Vermeulen L, Snippert HJ. 2014. Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nature reviews. Cancer* 14: 468-480.

Vllasaliu D, Falcone FH, Stolnik S, Garnett M. 2014. Basement membrane influences intestinal epithelial cell growth and presents a barrier to the movement of macromolecules. *Experimental cell research* 323: 218-231.

Wright KM, Lyon KA, Leung H, Leahy DJ, Ma L, Ginty DD. 2012. Dystroglycan Organizes Axon Guidance Cue Localization and Axonal Pathfinding. *Neuron* 76: 931-944.

Yamada H, Saito F, Fukuta-Ohi H, Zhong D, Hase A, Arai K, Okuyama A, Maekawa R, Shimizu T, Matsumura K. 2001. Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Human molecular genetics* 10: 1563-1569.

Yang B, Jung D, Motto D, Meyer J, Koretzky G, Campbell KP. 1995. SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *The Journal of biological chemistry* 270: 11711-11714.

Yoneyama T, Angata K, Bao X, Courtneidge S, Chanda SK, Fukuda M. 2012. Fer kinase regulates cell migration through α -dystroglycan glycosylation. *Molecular biology of the cell* 23: 771-780.